

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Caracterización molecular, morfológica y morfométrica del complejo *Nephelomys albigularis* Tomes, 1860 (Rodentia: Cricetidae), y su distribución en el Ecuador.

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado
Ciencias Biológicas

NICOLÁS OSWALDO TINOCO LOPEZ

Quito, 2015

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Nicolás Oswaldo Tinoco López ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M.Sc. Santiago Burneo

Director de la Disertación

17 de noviembre de 2015

Pasión y curiosidad, por la vida

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento para la realización del presente proyecto.

A la fundación EcoCiencia por la beca entregada por medio del programa de EcoBecas financiado por EcoFondo.

A Pablo Moreno del Mueso Gustavo Orces de la Universidad Politécnica Nacional y a Jorge Brito del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales. Por su colaboración al momento de revisar las colecciones.

A Carlos Boada por gran amistad, y enseñare la emoción y pasión por investigar,

A mi director de tesis Santiago Burneo por su gran paciencia y apoyo durante la realización de esta investigación.

A Alejandra Camacho, Daniel Chaves y Simón Lobos por sus valiosos consejos.

A Roberto Kaslín por su valiosa ayuda en la fase de campo.

A Andrea Vallejo, Sarah Vaca, Verónica Leiva, Ana Belén Ribadeneira, Ricardo Zambrano y demás personal del QCAZ-M por valiosa ayuda y compañía.

A Liliana Jaramillo, Gabriela Castillo y Daniel Zurita, por su ayuda durante la realización de la fase de laboratorio, y por su compañía durante las largas horas de trabajo.

A Cecilia Tobar y Silvia Vallejo por su apoyo durante el desarrollo del programa de EcoBecas.

A Elizabeth Vásquez, Francisca Hervas, Roberto Kaslín, Daniel Escobar, Daniel Ribadeneira, Angelita López, Andrea Vallejo por su valiosa amistad y apoyo durante todo este tiempo.

A mi madre y mis hermanos por estar siempre a mi lado, y por demostrarme que camino al éxito requiere esfuerzo y sacrificio.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 <i>Nephelomys albigularis</i> en Ecuador.....	4
3.2 Historia taxonómica de <i>Nephelomys albigularis</i>	4
3.3 Sistemática molecular.....	6
3.4 Objetivos.....	8
4. METODOLOGÍA.....	9
4.1 Extracción de ADN.....	9
4.2 Análisis filogenéticos de inferencia bayesiana (IB) y máxima verosimilitud (MV).....	10
4.3 Distancias Genéticas.....	11
4.4 Delimitación de especies.....	11
4.5 Análisis Morfométricos.....	12
4.5.1 Análisis estadísticos.....	13
4.6 Análisis de la morfología craneal y coloración.....	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5.1 Relaciones filogenéticas.....	15
5.2 Distancias Genéticas.....	16
5.3 Delimitación e identificación de especies.....	17
5.4 Análisis Morfométricos, MANOVA, NMDS y AD.....	19

5.5	Análisis de la morfología craneal y la coloración.....	19
5.5.1	Morfología craneal.....	19
5.5.2	Patrones de coloración.....	22
5.6	Sistemática del Género <i>Nephelomys</i>	24
5.6.1	Relaciones filogenéticas del género <i>Nephelomys</i> en el Ecuador.....	24
5.6.2	Filogeografía de las especies del género <i>Nephelomys</i> en el Ecuador.....	26
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
7	BIBLIOGRAFÍA.....	30
8	FIGURAS.....	44
9	TABLAS.....	61
10	ANEXOS.....	68

LISTA DE FIGURAS

1. Distribución de <i>Nephelomys albigularis</i> , <i>Nephelomys auriventer</i> , <i>Nephelomys moerex</i> , <i>Nephelomys nimbosus</i>	44
2. Medidas morfológicas tomadas en el presente estudio.....	45
3. Filogenia de <i>Nephelomys</i> . Árbol basado en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, obtenido del análisis de alrededor de 800 pb del gen mitocondrial Citocromo b.....	46
4. Filogenia de <i>Nephelomys</i> . Árbol basado en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, obtenido del análisis de alrededor de 800 pb del gen mitocondrial Citocromo b.....	47
5. Filogenia de <i>Nephelomys</i> . Árbol basado en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, obtenido del análisis de alrededor de 700 pb del intrón de la cadena Beta del Fibrinógeno.....	48
6. Filogenia concatenada de <i>Nephelomys</i> . Árbol basado en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, obtenido del análisis de alrededor de 800 pb del gen mitocondrial Citocromo b y del intrón de la cadena Beta del Fibrinógeno de 700pb.....	49
7. Delimitación de las especies putativas en base al modelo Poisson Tree Process. Filogenia de Inferencia Bayesiana en base al gen mitocondrial citocromo b.....	50
8. Delimitación de las especies putativas en base al modelo Poisson Tree Process. Filogenia de Inferencia Bayesiana en base al intron del beta fibrinógeno.....	51

9. Análisis de Escalonamiento Multidimensional obtenido a partir de las variables morfológicas de machos y hembras adultos de los clados A, B y C.....	52
10. Análisis discriminantes de las medidas de las variables morfológicas de machos y hembras adultos de los clados A, B y C.....	53
11. Vista ventral del foramen incisivo.....	54
12. Vista ventral de la fosa mesopterigoidea.....	55
13. Vista lateral del proceso paraoccipital.....	56
14. Vista lateral de la mandíbula.....	57
15. Piel de los grupos filogenéticos del género <i>Nephelomys</i>	58
16. Filogenia de la tribu <i>Oryzomini</i>	59
17. Localización geográfica de los clados y subclados obtenidos en base al gen mitocondrial citocromo b.....	60

LISTA DE TABLAS

1. Distancias genéticas corregidas en base al modelo Kimura-2 parámetros del gen citocromo b.....	61
2. Distancias genéticas (p) no corregidas y corregidas (desviación estándar) en base a tres modelos de sustitución Jukes-Cantor, Kimura-2 parámetros y Tamura Nei y Fgb-7, del gen Cytb y el intrón Fgb-7.....	62
3. Distancias genéticas del gen Cytb y el intrón Fgb-7 reportadas en otros trabajos sobre roedores.....	63
4. Resultados del análisis de delimitación de especies en base al P (AB), pID del genero <i>Nephelomys</i> , a partir del árbol bayesiano del gen Cytb y del intrón Fgb-7.....	64
5. Soportes de las especies putativas obtenidas del modelo PTP en base al árbol filogenético de Inferencia Bayesiana del gen Cytb y el intrón Fgb-7.....	65
6. Análisis de varianza multivariado de los caracteres morfométricos, entre los clados A, B y C, y entre sexos. Datos transformados con Log10.....	66
7. Análisis de varianza multivariado de los caracteres morfométricos, entre los clados A, B y C, y entre sexos. Datos transformados en porcentajes.....	67

LISTA DE ANEXOS

1. Protocolo de extracción de ADN del laboratorio de Biología Molecular.....	68
2. Condiciones térmicas usada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del gen mitocondrial citocromo b y el intrón de la cadena beta del fibrinógeno.....	70
3. Estrategias de particiones utilizadas en los análisis filogenéticos para el gen Cytb y el intron Fgb-7.....	71
4. Medidas craneales y mandibulares.....	72
5. Colores identificados en base a Ridgway 1912.....	74
6. Mecanismo de especiación alopátrica, reportado para micromamíferos no voladores.....	75
7. Cronograma ilustrando la diversificación de la subfamilia Sigmodontinae.....	76
8. Lista de individuos incluidos en las reconstrucciones filogenéticas.....	77
9. Secuencias obtenidas del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) en las reconstrucciones filogenéticas.....	78
10. Lista de especímenes utilizados en los análisis morfométricos.....	79

1. RESUMEN

El ratón de garganta blanca de Tómes, *Nephelomys albigularis* se distribuye desde el norte de Ecuador hasta el sur de Perú. En Ecuador se distribuye a ambos lados de la cordillera de los Andes. Esta especie es considerada monotípica.

En este trabajo se aclara la identidad taxonómica y las relaciones filogenéticas de *N. albigularis*, basados en análisis filogenéticos del gen mitocondrial citocromo b y el intrón del gen nuclear beta fibrinógeno; además con la finalidad de identificar patrones morfológicos se revisaron caracteres craneo mandibulares y se realizó un análisis morfométrico craneal.

Los resultados filogenéticos y morfológicos fueron congruentes entre sí, y determinaron la existencia de cinco entidades, agrupadas en tres clados nombrados A, B y C. El clado A se distribuye al norte del Ecuador, y presentó dos subclados altamente soportados AI y AII, el clado B se distribuye al noroccidente del país, y el clado C, que se distribuye desde el centro hasta el sur del Ecuador, presentó dos subclados altamente soportados, CI y CII. De las cinco entidades identificadas dos son especies descritas formalmente, *N. moerex* (clado B) y *N. albigularis* (subclado CII), mientras que las otras tres entidades podrían ser serían consideradas como especies candidatas no confirmadas.

Palabras clave: *Nephelomys*, Citocromo b, Intrón, delimitación de especies, filogenia.

2. ABSTRACT

The White-throated Nephelomys, *Nephelomys albigularis* is distributed from Northern Ecuador to Southern Peru. In Ecuador it occurs at both sides of the Andes. This species is considered monotypic.

This work clarifies the taxonomic identity and phylogenetic relationships of *N. albigularis*, based on phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome b gene and the intron of the nuclear gene beta fibrinogen; in addition, to identify morphological patterns, characters of the skull and jaw were assessed, and a morphometric analysis was carried out.

Phylogenetic and morphological results were consistent with each other and determined the existence of five independent evolutionary lineages, grouped into three clades named A, B, and C. Clade A is distributed in Northern Ecuador and has two highly supported subclades, AI and AII. Clade B is distributed in northwestern Ecuador. Clade C spreads to the South Central region of Ecuador and has two well-supported subclades, CI and CII. Of the five identified lineages, two represent formally described species, *N. moerex* (clade B) and *N. albigularis* (subclade CII), while the other three entities are considered unconfirmed candidate species.

Keywords: *Nephelomys*, Cytochrome b, Intron, phylogeny, species delimitation.

3. INTRODUCCIÓN

Los roedores son el orden más diverso de mamíferos, con más de 2 270 especies reconocidas, lo que representa un 43,5% de todos los mamíferos del mundo (Musser y Carleton, 2005; Wilson y Mittermeier, 2009). Dentro del orden Rodentia una de las radiaciones más importantes se ha producido dentro de la familia Cricetidae, en la subfamilia Sigmodontinae, siendo un grupo monofilético que incluye solamente a roedores presentes en el Neotrópico (Reig, 1986; Smith and Patton, 1999; Jansa and Weksler, 2004; Weksler, 2006). En Ecuador, de este orden, están presentes diez familias, 54 géneros y 111 especies (Tirira 2015).

El género *Nephelomys* incluye trece especies, que se distribuyen a lo largo de la Cordillera de los Andes, desde Bolivia hasta Costa Rica, y parte de las montañas costeras del este de Venezuela (Weksler *et al.*, 2006). Para Ecuador están reportadas cuatro especies (Figura 1): *N. albigularis*, que habita en las regiones subtropicales y templadas del Ecuador, a ambos lados de los Andes, principalmente dentro de los bosques nublados (Tirira, 2007); *N. auriventer* se conoce de su presencia en Ecuador solamente por tres localidades, en el Río Pastaza, entre las provincias de Pastaza y Tungurahua (Percequillo, 2003; Prado y Percequillo, 2013); *N. moerex* es una especie endémica del Ecuador, se conoce que habita en los bosques nublados occidentales, pero se desconoce los límites de su distribución (Moreno, 2009; Percequillo, 2015); y, *N. nimbosus* que también es endémico del Ecuador, se conoce de su presencia por pocas localidades en los bosques nublados orientales en las provincias de Napo y Tungurahua (Prado y Percequillo, 2013; Percequillo, 2015).

3.1 *Nephelomys albigularis* en Ecuador.

Es un roedor de tamaño mediano (cabeza-cuerpo 102–162 mm) con la cola más larga que el cuerpo (138–184 mm), la cola puede ser bicolor o ligeramente bicoloreada. El cuerpo presenta una coloración dorsal marrón oscura a marrón anaranjada, la región ventral es gris blancuzca o crema, con un parche de color blancuzco en la región gular. Las patas anteriores son más cortas que las posteriores y poseen cinco dedos, se encuentran cubiertas por pelos alargados, estos últimos se extienden sobre las garras (Tomes, 1860; Tirira, 2007; Percequillo, 2003, 2015).

En Ecuador habita en los bosques subtropicales, templados y alto andinos bajos, entre 1 000 a 3 400 msnm, su límite más boreal es al nororiente de la provincia de Carchi, Reserva Biológica Guandera, y su límite más austral es al norte de la provincia de Loja, Celica (Tirira y Boada, 2009; Percequillo, 2015). Es de actividad diurna y nocturna. Se presenta con mayor frecuencia en los bosques nublados, y está asociado a cuerpos de agua (Tirira, 2007; Percequillo, 2015).

3.2 Historia taxonómica de *Nephelomys albigularis*

Fue descrita originalmente como *Hesperomys albigularis* (BMNH 711105, 711106) por Tomes (1860), siendo la localidad tipo Pallatanga en la provincia de Chimborazo. Esta especie ha sufrido cambios en su nomenclatura taxonómica, los más destacados son los efectuados por Olfied Thomas, quien propuso el cambio de género, de *Hesperomys* a *Calomys* y, posteriormente, a *Oryzomys* (Percequillo, 2003). Thomas en 1914 describe una nueva subespecie, *Oryzomys albigularis moerex*, la cual presentaba ciertas similitudes morfológicas con *O. albigularis* pero, a su vez, presentaba variación en otros caracteres (hueso lagrimal, foramen incisivo, entre otros). En 1944 Hershkovitz, desconociendo de la variación morfológica existente en ciertos especímenes, sinonimizó todas las subespecies

(*caracolus*, *childi*, *devius*, *keaysi*, *levipes*, *maculiventer*, *meridensis*, *pectoralis*, *pirrensis*) bajo el mismo nombre, *Oryzomys albigularis*, con excepción de *Oryzomys albigularis moerex*, y lo llamó “complejo *albigularis*”.

Cabrera, en 1961 vuelve a asignar la categoría de subespecie a las sinonimizadas por Hershkovitz. En 1993 Musser y Carleton proponen que solamente ocho subespecies están asociadas con *Oryzomys albigularis*. Después de varios estudios morfológicos y genéticos, el género *Oryzomys* demostró no ser monofilético (Bonvicino y Moreira 2001, Weksler 2006). Weksler y colaboradores (2006) proponen una nueva clasificación, asignando un género nuevo a los grupos de especies previamente establecidos. Al grupo “*albigularis*” se le asignó el género *Nephelomys*, nombre que proviene del griego *nephelê* (nubes o neblina) ya que las especies habitan en los bosques nublados de las estribaciones de ambos lados de la cordillera de los Andes. Como consecuencia se validaron trece especies, una de ellas *Nephelomys albigularis*.

Percequillo (2015) propone que la especie *Nephelomys albigularis* es monotípica a lo largo de toda su distribución, que va desde el norte del Ecuador (Tirira y Boada, 2009) hasta el noreste de Perú (Figura 1). En estudios sistemáticos previos (Percequillo *et al* 2011, Pine *et al* 2012) sobre roedores del Neotrópico, esta especie ha sido representada por una única secuencia proveniente de la localidad Las Ashitas, Cajamarca, al noreste de Perú. El aporte de nuevas secuencias y nuevas localidades permitirá un mejor entendimiento sobre la evolución y diversificación del género *Nephelomys* dentro de las estribaciones andinas.

3.3 Sistemática molecular

La sistemática molecular utiliza marcadores genéticos para rastrear variaciones de ADN, lo que permite hacer inferencias acerca de sus relaciones filogenéticas y los procesos involucrados con los patrones de distribución. Se ha visto que el uso de intrones ha demostrado ser útil en estudios de aves como: carpinteros (Prychitko y Moore, 1997; 2000), cucuves y sinsontes (Lovette *et al.*, 2011); carnívoros como: lobos marinos (Slade *et al.*, 1994), mustelidos (Yu *et al.*, 2011) y algunos roedores (Peppers y Bradley, 2000; Carroll y Bradley, 2005; Henson y Bradley, 2009; Lessmann *et al.*, 2011, Rosa *et al.*, 2012, Machado *et al.*, 2013); debido a que presenta una tasa de evolución más alta que los exones, ya que no están sujetos a selección y por lo tanto puede acumular más mutaciones (Zhang y Hewitt, 2003). Por su lado, el gen mitocondrial Cytb ha demostrado ser útil en muchos estudios filogenéticos de roedores Sigmodontinos (Smith y Patton, 1991; 1993; 1999; 2007; Patton *et al.*, 2000; D'Elia, 2003; Miranda, 2007; Bradley *et al.*, 2008; D'Elia *et al.*, 2008; Catzefflis y Tilak, 2009; Agrellos *et al.*, 2012) debido a que posee una alta tasa de evolución, lo que permite que las mutaciones se acumulen más rápidamente que en los genes nucleares (Irwin *et al.*, 1991; Krebs *et al.*, 2013).

El avance en las técnicas moleculares en conjunto con análisis morfológicos y ecológicos, han sido de gran ayuda para la correcta identificación y delimitación de diferentes organismos como: mariposas (Hebert *et al.*, 2004), anfibios (Funk *et al.*, 2011), micromamíferos (Peppers y Bradley 2000; Borisenko *et al.*, 2008); puesto que la mayoría de las descripciones se basan únicamente en caracteres morfológicos. Se ha demostrado que existe una cantidad considerable de especies crípticas que han sido clasificadas bajo un solo nombre debido a que, morfológicamente presentan una gran similitud (Hebert *et al.*, 2004; Bickford *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta la complejidad y la subjetividad de la taxonomía clásica, en los últimos años se ha optado por el uso combinado de sets de caracteres independientes entre sí (filogeografía, morfología comparada, genética de poblaciones, ecología, biología del desarrollo, etología, etc.) Este campo se conoce como taxonomía integrativa, dentro del cual se recomienda que debe existir una amplia evidencia para poder nombrar una nueva especie (Dayrat, 2005). Ha sido de gran utilidad al momento de estudiar especies crípticas, pues se cuenta con mayor información y las delimitaciones son más reales y robustas, eliminando el factor de subjetividad (Bickford *et al.*, 2007).

3.4 Objetivos

General

- Estudiar la taxonomía de las poblaciones de *Nephelomys albigularis* del Ecuador.

Específicos

- Analizar si la variabilidad genética, morfológica y morfométrica de *Nephelomys albigularis* es evidencia de un posible complejo de especies crípticas.
- Establecer si las diferentes poblaciones de *Nephelomys albigularis* de Ecuador corresponden a la especie *sensu stricto* descrita por Tomes en 1860 (*Hesperomys albigularis*).
- Determinar si *Nephelomys moerex* es una especie válida.
- Identificar el tipo de especiación que pudo actuar en la diversificación del género *Nephelomys*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de hígado, músculo y piel obtenidas de especímenes seleccionados de la Sección Mastozoología del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ-M), del Instituto de Ciencias Biológicas de la Escuela Politécnica Nacional (MEPN) y del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN). También se utilizaron muestras de tejidos de especímenes colectados en la localidad de Mindo, provincia de Pichincha. Se obtuvo un total de 85 muestras de tejidos. Los especímenes fueron seleccionados tratando de abarcar toda la distribución de *N. albigularis* y de *N. moerex*. De cada localidad se escogieron al menos cinco especímenes, dos machos adultos, dos hembras, adultas y un juvenil, en algunas localidades solamente se logró obtener uno o dos especímenes.

La extracción de ADN se realizó en base al protocolo de tiocinato de guanidina, utilizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Museo de Zoología (Anexo 1) de todos los especímenes seleccionados. Los genes secuenciados fueron el gen mitocondrial citocromo b (Cytb), ya que ha sido utilizado en múltiples estudios filogenéticos en micromamíferos, y el intrón del beta fibrinógeno (Fgb-7) que ha demostrado ser de mucha utilidad (Wickliffe *et al.*, 2003). Los cebadores usados para la amplificación de gen mitocondrial citocromo b (Cytb) fueron: MVZ05 y MVZ16, y los cebadores para el intrón del beta fibrinógeno (Fgb-7) fueron: Fgb-I7U-Rattus y Fgb-I7L-Rattus. Las condiciones térmicas de la amplificación del Cytb fueron las usadas por Smith y Patton (1993) y para el intrón Fgb-7 se usaron las condiciones térmicas usadas por Wickliffe y colaboradores (2003) (Anexo 2). Se secuenciaron especímenes identificados como *N. albigularis*, *N. moerex*, *N. sp*, *N. auriventer*.

4.2 Análisis filogenéticos de inferencia bayesiana (IB) y de máxima verosimilitud (MV)

Las secuencias obtenidas fueron editadas en el programa Geneious 5.4.7 y alineadas con la herramienta ClustalW. Los modelos de evolución para el gen Cytb y el intrón Fgb-7 y el mejor esquema de partición para el análisis fueron estimados por medio del programa PartitionFinder (Lanfear *et al.*, 2012; Anexo 3). Se obtuvieron secuencias del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés) de los dos genes utilizados y como grupos externos se basó en los trabajos de Carrol y Bradley (2005), Weksler (2006), Percequillo y colaboradores (2011), Pine y colaboradores (2012), Parada y colaboradores (2012, 2015), se seleccionaron miembros de la subfamilia Tylomyinae (*Tylomys nudicaudus*), y de la subfamilia Sigmodontinae *Sigmodon hispidus* y *Zygodontomys brevicauda* (Tribu: Sigmodontini), también se usaron como secuencias de *Thomasomys aureus* (Tribu: Thomasomyini), *Oecomys*, *Euryoryzomys*, *Handleyomys*, *Neacomys* y *Nectomys* (Tribu: Oryzomyini), para de esta forma confirmar la monofilia del género *Nephelomys*.

Se realizó un análisis de Inferencia Bayesiana (IB) en el programa Mr. Bayes 3.1 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Se corrieron cuatro cadenas de MCMC, con dos búsquedas por 20 millones de generaciones. Se muestrearon cada 1000 generaciones, con un total de 40 000 árboles, y se descartó el 25% de los árboles como *burn-in*. La convergencia de las cadenas se visualizó con los valores de probabilidad (-lnL), y por el tamaño efectivo de la muestra (ESS > 200) en el programa Tracer v1.5 (Drummond y Rambaut, 2009). Para obtener el árbol consenso se utilizó los restantes 30 000 árboles y por medio de la regla mayoritaria del 50% en el programa MESQUITE 3.0. Los nodos con probabilidades posteriores (PP) mayores a 95% fueron considerados con alto soporte.

También se realizó un análisis de Máxima Verosimilitud (MV), se corrieron 20 análisis independientes (10 de árboles stepwise y 10 de árboles al azar) para encontrar el árbol de máxima verosimilitud usando los modelos obtenidos en programa PartitionFinder bajo el criterio BIC. El soporte para cada nodo se evaluó con la técnica de bootstrap no paramétrico (Felsenstein, 1985), dos búsquedas con 500 réplicas de bootstrap para cada gen y para los datos combinados, bajo los mismos parámetros usados durante la búsqueda del árbol. Se asumió que clados con un buen soporte fueron aquellos que estuvieron representados >70% de los árboles (Zharkikh y Li, 1992).

4.3 Distancias genéticas

Las distancias genéticas *p* no corregidas y corregidas se estimaron de la matriz con las secuencias alineadas en el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Para las distancias corregidas se utilizó el modelo Jukes-Cantor, Kimura-2 parámetros (K-2) y Tamura-Nei (TN), para realizar comparaciones con otros trabajos.

4.4 Delimitación de especies

Para la delimitación de especies se utilizó la herramienta *Species Delimitation* de Geneious Pro 5.4.7 en base a los métodos P(AB) (Rosenberg, 2007) y p ID (Masters *et al.*, 2011). El P(AB) es la probabilidad de monofilia recíproca dentro del modelo nulo de coalescencia aleatoria. Cuando los valores de P(AB) son menores a 1×10^{-5} la hipótesis nula es rechazada (Rosenberg, 2007). El pID es la probabilidad media, que una especie putativa se encuentre dentro (Estricto), o sea hermana (Liberal) de las especies del clado en un árbol, con un 95% como mínimo de intervalo de confianza (Ross *et al.*, 2008 Masters *et al.*, 2011). El tamaño de muestra óptimo para ambos métodos es de diez secuencias entre las especies A y B, con un número mínimo de cinco secuencias por especie (Rosenberg, 2007).

Por otro lado, se aplicó el análisis Proceso de Árbol de Poisson (*Poisson Tree process*, PTP; Zhang et al., 2013), que se basa en un criterio operacional de coalescencia de genes en función del número de eventos de sustitución a lo largo de las ramas de la filogenia. El análisis asume que el número de sustituciones entre especies es significativamente mayor que el número de sustituciones dentro de las especies. Estas diferencias son reflejadas por las longitudes de rama. A su vez estas sustituciones tienen una distribución exponencial al principio, y llegado a cierto número se estabilizan alcanzando una distribución de Poisson (Zhang et al., 2013). Se corrieron dos análisis, uno por cada gen. El número de generaciones de la MCMC fue 200 000 para Cytb y 100 000 para Fgb-7). El valor de adelgazamiento fue 100, un *burn-in* de 25%. La convergencia de la MCMC se confirmó visualmente.

Se usó el criterio de Vieites y colaboradores (2009) para delimitar e identificar especies candidatas no confirmadas (ECN) y especies candidatas confirmadas (ECC). Las ECN presentan una baja diferenciación genética y la información sobre morfología, ecología y distribución es deficiente. Las ECC son especies con un nivel de diferenciación detectable y se encuentra en concordancia con diferencias en un carácter que media la reproducción o que es un carácter morfológico diagnóstico para el respectivo grupo.

4.5 Análisis morfométricos

Se examinaron 189 especímenes de los cuales 36 fueron secuenciados. Para determinar la edad se utilizó el criterio de Percequillo (2003), el cual se basa en el nivel de erupción y de desgaste de la superficie oclusal de los molares superiores.

- Clase I (CE1): el M1 y M2 no presenta desgaste aparente. Las cúspides están separadas por profundos valles. Anterolofo, mesolofo y posterolofo son estructuras fácilmente reconocibles. El M3 no se encuentra eclosionado, en otros está eclosionado pero

tiene la corona todavía cerrada. La sutura esfenoccipital está totalmente abierta, llena de tejido cartilaginoso.

- Clase II (CE2): el M1 y M2 presentan un pequeño desgaste, con las cúspides diferenciadas, el anterolofa y mesolofa pueden estar conectados por puentes, pero aún son fácilmente reconocibles. El M3 presenta un desgaste mínimo. La sutura esfenoccipital presenta una osificación temprana, que comienza por los extremos.

- Clase III (CE3): el M1 y M2 presentan un desgaste medio acentuado, con las cúspides más bajas. El anterolofa, mesolofa y posterolofa están reducidos, en algunos casos no se pueden distinguir uno de otro. El M3 presenta un desgaste notable, con la superficie oclusal plana o ligeramente cóncava.

Se tomaron 26 medidas craneales, y tres medidas mandibulares basadas en estudios previos de micromamíferos no voladores (Voss, 1988; Percequillo, 2003; Alvarado y D'Elía, 2013) (Figura 2, Anexo 4).

4.5.1 Análisis estadísticos

Las medidas registradas fueron transformadas con logaritmo de base 10 para cumplir los supuestos necesarios de las pruebas multivariadas (Guisande *et al.*, 2014), y para eliminar el efecto del tamaño se transformó los valores de las medidas en porcentajes (Hair *et al.*, 1998) al dividir cada medida para la medida de mayor longitud (medida/Longitud Occipitonasal ONL).

Se realizó un Análisis Multivariado de la Varianza (MANOVA), este análisis permite detectar si existen diferencias morfométricas entre los grupos asignados *a priori* (Sánchez, 2012). Como factores dependientes se usaron las 26 medidas morfométricas y como factores fijos o independientes se emplearon los siguientes grupos: machos, hembras, y como una sola especie, y posteriormente se repitió el análisis pero esta vez se utilizaron los

resultados del análisis filogenético (Clado A, Clado B, Clado C, Subclado CI, CII) para realizar la clasificación *a priori*.

El Análisis de Escalonamiento Multidimensional (NDMS) permite visualizar de forma gráfica el nivel de similitud entre grupos en base a distintas variables. Los grupos deben ser asignados *a priori*, en este caso los grupos fueron asignados en base a los resultados de los análisis filogenéticos y en base al género (machos y hembras).

El Análisis Discriminante (AD) permite que, a partir de una clasificación inicial, se pueda obtener una nueva clasificación en función de los valores observados de un conjunto de variables cuantitativas, los conjuntos fueron asignados *a priori*, en base a los resultados de los análisis filogenéticos.

El Análisis Multivariado de la varianza (MANOVA) se realizó en el programa SPSS V20, y los demás análisis en el programa R-Wizard versión 1.0. (Guisande *et al.*, 2014).

4.6 Análisis de la morfología craneal y la coloración

Se examinaron diferentes estructuras craneales como el puente palatino, los huesos nasales, la bula auditiva entre otros, y estructuras mandibulares como el proceso coronoideo y el proceso angular, de un total de 514, de los cuales 90 fueron secuenciados. Además se analizaron los patrones de coloración corporal, de las extremidades y la cola, para definir la coloración se utilizó la paleta de colores de Robert Ridgway (1912, Anexo 5).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Relaciones filogenéticas

Se obtuvieron un total de 90 secuencias del gen mitocondrial citocromo b (Cytb) de alrededor de 800 pb, mientras que del intrón del beta fibrinógeno (Fgb-7) se obtuvieron 53 secuencias de alrededor de 700 pb.

Los árboles resultantes del análisis de Inferencia Bayesiana (IB) y Máxima Verosimilitud (MV), mostraron topologías parecidas. En el caso del árbol en base al gen Cytb se obtuvieron tres clados los cuales fueron nombrados A (PP = 0.84/bootstrap = 94), B (PP = 0.99/bootstrap = 87) y C (PP = 0.99/bootstrap = 90) (Figura 3).

- Clado A: Incluye a nueve especímenes de *N. albigularis* que habitan en las estribaciones nororientales y presenta un soporte alto (0.84/90, Figura 4a y 19); dentro de este clado existen dos subclados con un alto soporte, AI y AII. El subclado AI incluye un solo espécimen de las estribaciones orientales de Cuyuja, provincia de Napo; el subclado AII incluye los especímenes de las estribaciones nororientales (Fig. 19).

- Clado B: Incluye a 38 especímenes de *N. moerex* de las estribaciones noroccidentales, este presenta un soporte alto (0,99/100, Figura 4b y 19), aunque internamente no presentó una clara resolución filogenética.

- Clado C: Incluye a 43 especímenes de las estribaciones occidentales y orientales, y presenta un alto soporte (0,99/90, Figuras 4c y 19); este clado presenta dos subclados altamente soportados. El primer subclado nombrado CI incluye a los especímenes de las estribaciones orientales; éste se encuentra relacionado a un segundo subclado nombrado CII, el cual incluye a los especímenes de las estribaciones occidentales y surorientales.

En el caso del intrón Fgb-7 solo se pudo evidenciar dos clados, que fueron nombrados A y B (Figura 5):

- Clado A: Incluye a nueve especímenes *N. albigularis* de las estribaciones del norte (los mismos que en AI y AII Cytb), este clado tiene un soporte alto (0,75/94), internamente no presentó una clara resolución filogenética.

- Clado B: Incluye a 17 especímenes de *N. moerex* de las estribaciones noroccidentales y 27 especímenes de *N. albigularis* del centro y sur, este clado es altamente soportado (0,99/98), internamente no presentó una clara resolución filogenética.

En el caso del análisis de la matriz concatenada del gen Cytb y el intrón Fgb-7, se obtuvieron los mismos grupos filogenéticos que se obtuvieron en el árbol del Cytb con un soporte alto (A = 0.99/80, B = 0.99/100, C = 0.99/80, Figura 6).

La distinción de los grupos filogenéticos encontrados fue congruente tanto en los análisis de genes individuales y combinados, la monofilia de cada grupo se confirmó con los altos valores de las probabilidades posteriores (PP): subclado AI (Cytb: 0.97, Fgb-7: 0.96, Cytb+Fgb-7: 0.99), subclado AII (0.99, 0.75, 0.99), clado B (0.99, -, 0.99), subclado CI (0.99, -, 0.99) y subclado CII (0.87, 0.85, 0.82). Así mismo la parafilia de *N. albigularis* fue congruente en el análisis del Cytb y el análisis combinado (Cytb+Fgb-7). La parafilia se da entre los especímenes del norte (AI, AII) y del sur (CI y CII). En el caso de *N. moerex* (B) este sí resultó ser monofilético (Cytb y Cytb+Fgb-7); y está más relacionado con los grupos del sur CI y CII. Igualmente el género *Nephelomys* resultó parafilético con respecto al género *Mindomys* (Figuras 4, 5, 6).

5.2 Distancias genéticas

A modo de comparación con otros trabajos las distancias genéticas fueron corregidas en base a tres modelos de sustitución: Jukes-Cantor (JC), Kimura-2 parámetros (K2-P), Tamura-Nei (TN), que son los utilizados en otros trabajos de sistemática de roedores. Muchas especies de roedores que habitan a lo largo de los Andes poseen distancias

genéticas relativamente bajas entre sí debido a que han sufrido procesos de especiación recientes, por ejemplo algunos roedores Akodontinos (Smith y Patton, 1991, 1999, 2007; D'Elía, 2003), Oryzominos (Miranda 2007) y Thomasominos (Pacheco 2003) tienen una distancia genética del 2% (gen Cytb) y son reconocidas como especies distintas. Al revisar las distancias genéticas corregidas con el modelo K2-P, se pudo observar que la distancia de los grupos filogenéticos encontrados (A vs B = 6.81%; B vs C = 6.62%; AI vs AII = 5.72% ; CI vs CII = 4.71; Tabla 1) se encuentran dentro del rango propuesto por Bradley y Baker (2001), quienes proponen que una distancia genética corregida mayor al 2% hasta un 9% permitiría establecer que existe una variación interespecífica y que se pueden considerar como especies hermanas, valores por debajo de 2% serían consideradas como variaciones entre poblaciones, mientras que valores superiores a 9% serían evidencia de una variación intragenérica. Estos valores son parecidos a los reportados en las descripciones de nuevas especies de roedores sigmodontinos con respecto a sus especies hermanas (*Abrothrix manni* 5,2% D'Elía *et al.*, 2015, *Neusticomys vossi* 8,5% Hanson *et al.*, 2015, *Rhipidomys itoan* y *Rhipidomys tribe* 8,27% Costa *et al.*, 2011, Tabla 2)

En base a la diferenciación genética encontrada entre los grupos filogenéticos estos pueden ser considerados como especies candidatas, siendo B y CII especies ya descritas como *N. moerex* y *N. albigularis* respectivamente; mientras que AI, AII y CI serían especies nuevas.

5.3 Delimitación e identificación de especies

En las pruebas estadísticas P(AB) y pID mostraron un alto soporte para la distinción filogenética de los tres clados (A, B y C) y los subclados CI y CII obtenidos con el gen Cytb, mientras que con el intrón Fgb-7 también se evidenció un alto soporte para la distinción entre el clado A y B respectivamente. En todos los casos, excepto entre los

subclados CI y CII, la probabilidad de monofilia recíproca fue menor a 1×10^{-5} . La baja probabilidad de monofilia recíproca $P(AB)$ entre los tres clados puede ser reconocida como evidencia de ausencia de flujo genético (Hamilton *et al.*, 2011, Tabla 4). En el caso de $pID_{(liberal \text{ y } estricto)}$ los valores obtenidos fueron mayores a 0,70 (Tabla 4); pero al observar los valores de $pID_{(liberal)}$ estos fueron mayores a los valores de $pID_{(estricto)}$ (Tabla 4), por cual se puede considerar que el clado B es taxón hermano al clado C, y los subclados CI y CII son especies hermanas entre sí.

El modelo PTP identificó un total de ocho especies putativas dentro del género *Nephelomys* y cinco dentro del complejo “*albigularis*” en base al Cytb (Figura 7), mientras que en base al intrón Fgb-7 se identificaron tres especies putativas dentro del género *Nephelomys*, y dentro del complejo “*albigularis*” solo se identificaron dos especies putativas (Figura 8). En base al árbol del Cytb, las especies putativas 4 y 6 obtuvieron valores de soporte altos, mientras que las especies putativas 5, 7 y 8 presentaron soportes bajos (Tabla 5); en el caso del intrón Fgb-7 el soporte entre las especies putativas B y C igualmente fue bajo (Tabla 5). Esto puede deberse a que la divergencia dentro del género es reciente (Parada *et al.*, 2013; Prada *et al.*, 2014).

Los análisis de delimitación de especies reconocieron cinco especies putativas, las cuales coincidieron con los grupos filogenéticos encontrados (AI, AII, B, CI, CII) por lo cual se las puede considerar como especies distintas.

5.4 Análisis morfométricos. Análisis de la varianza (MANOVA), escalonamiento multidimensional (NMDS) y análisis discriminante (AD)

En el análisis de Escalonamiento Multidimensional (NMDS) el gráfico permite observar que existe un agrupamiento entre las variables de los tres clados A, B y C (Figura 8). El valor de medida de ajuste (stress) fue del 15,9%, este es considerado un porcentaje pobre, lo cual demuestra que no es posible diferenciar a los grupos filogenéticos en función de su morfometría (Figura 8). El Análisis Discriminante (AD) permitió evidenciar que los especímenes del clado A pueden ser diferenciados de los demás clados en función de la longitud y ancho del foramen incisivo (LIF) y la longitud de la placa ósea (LBP), mientras que los clados B y C no pueden ser diferenciados morfológicamente entre sí (Figura 10).

El análisis de la varianza (MANOVA) indicó que existen diferencias morfométricas entre los tres clados (A, B y C), y esto coincide con los resultados del análisis discriminante. Mientras que dentro de cada clado (A, B y C) no existe diferencias morfométricas entre machos y hembras, esto podría considerarse como una evidencia que no existe dimorfismo sexual (Tablas 6 y 7), esto coincide con lo reportado para otra especie del mismo género *N. caracolus* (Rivas y Péfaur, 1999a).

5.5 Análisis de la morfología craneal y la coloración

5.5.1 Morfología craneal

Al observar la morfología de los cinco grupos filogenéticos se encontró que ciertos caracteres craneales y mandibulares presentaban formas distintas y características para cada grupo filogenético. Del grupo AI solo se revisó un espécimen, de AII: 17 especímenes, de B: 359 especímenes, de CI: 38 especímenes y de CII: 99. Todos los individuos presentan un cráneo alargado y robusto, con una depresión en la parte posterior, la caja craneal es redondeada con crestas temporales y lamboidales notorias. Los márgenes

de la región interorbital son convergentes anteriormente, y los márgenes supra-orbitales son redondeados y poco desarrollados

El foramen incisivo presenta dos formas dentro del clado A, el subclado AI con un foramen incisivo alargado, en la parte anterior más angosto cerrándose en ángulo agudo, mientras que la parte media es más ancha y los bordes presentan una pequeña muesca, y la parte posterior es redondeada (Figura 11); en el caso del subclado AII el foramen es más alargado que en el subclado AI, en la parte anterior es más angosto cerrándose en ángulo agudo, el borde es recto y no presenta ninguna muesca, y en la parte posterior se vuelve a ensanchar. En el clado B el foramen es corto, en la parte anterior es más estrecho y se cierra en ángulo agudo, los bordes externos en la parte media son continuos y hacia la parte posterior el foramen se ensancha. En el clado C se observaron dos formas muy similares; en CI el foramen incisivo es alargado, y los bordes externos son continuos, mientras que en CII la parte anterior es más angosta que en CI, y en la parte media se observa una muesca (Figura 11).

El proceso del palatino presenta dos formas, en los individuos del subclado AI el proceso palatino es corto, y se constriñe en el centro; en los individuos del subclado AII el proceso palatino es más alargado que en AI y presenta los bordes continuos; en los individuos del clado B el proceso palatino es alargado y delgado en la parte anterior; en los individuos del subclado CI el proceso palatino es ancho y alargado, mientras que en los individuos de CII el proceso es más delgado que en CI, con la parte anterior más delgada que la posterior (Figura 11).

La fosa mesopterigoidea de los individuos del subclado AI presenta el borde anterior bilobado, mientras que en el subclado AII el borde de la fosa es ovalado y con una pequeña muesca en la parte media; en los individuos del clado B la fosa tiene forma de pirámide

truncada, y en los individuos del subclado CI el borde de la fosa es ovalado y puntiagudo, presentando una pequeña muesca en la parte media del borde anterior, mientras que en los especímenes del subclado CII el borde es rectangular hacia la parte anterior y más ancho que en CI (Figura 12).

El proceso paraoccipital presentó formas distintas, en el caso del subclado AI el extremo distal del proceso es ancho y ligeramente cóncavo con los extremos romos, mientras que en los individuos del subclado AII el proceso es más cóncavo en su parte distal, mientras que los extremos son puntiagudos y de distinto tamaño. En los individuos del clado B el proceso presenta una morfología similar a AII, con la diferencia de que el extremo inferior es más corto y con la punta roma. En los individuos del subclado CI la parte distal no es tan cóncava y el extremo superior e inferior son cortos y anchos; mientras que en los individuos del subclado CII la parte distal del proceso es más cóncava que en el subclado CI, con el extremo superior más corto que el inferior (Figura 13).

En la morfología de la mandíbula se pudo observar que el proceso coronoideo presentó distintas formas; dentro del subclado AI es ancho y corto mientras que en el subclado AII es delgado y alargado; en ambos casos la punta del proceso se ubica por delante del proceso capsular. Dentro del clado B el proceso es delgado y alargado; la punta del proceso se ubica por detrás del proceso capsular. En el subclado CI el proceso coronoideo es ancho (más que en B) y alargado, y la punta del proceso se ubica por delante del proceso capsular; mientras que en el subclado CII el proceso es delgado y corto, y también se ubica por delante del proceso capsular (Figura 14 y 15).

Las diferencias que se observaron en los caracteres mandibulares podrían estar relacionadas con factores ecológicos (competencia) que en algunos casos pueden promover la diferenciación genética, estos factores pueden provocar que ciertas estructuras óseas

cambien su forma, en roedores estos cambios se pueden observar en ciertas estructuras mandibulares (Renaud, *et al.*, 2007; Samuels, 2009), estas diferencias pueden sugerir que existe cierto grado de especialización en el tipo de alimento que consumen, y que tengan que ejercer mayor o menor fuerza al momento de roer o morder (Woods 1972; Woods y Howland, 1979; Pough *et al.*, 2013).

5.5.2 Patrones de coloración

A continuación se describen los patrones de coloración de cada uno de los clados encontrados

- Clado A: presentó dos patrones de coloración, el subclado AI presenta un dorso de color bermejo oscuro, con una franja oscura en la parte media, y los flancos más claros y contrastantes, el vientre presentó una coloración gris oscura con la punta de los pelos color leonado, y la zona gular presentó un parche bien definido de color cenizo verde pálido. El subclado AII tiene dorso de color rojo prusiano oscuro con los flancos más claros, y en la zona central una franja más oscura, el vientre tiene una coloración gris blancuzca con la punta de los pelos de color blanco y con un parche de color blanco bien definido en la zona gular (Figuras 16 y 17).

La coloración en las patas fue la misma en ambos subclados, las patas delanteras presentaron un dorso de color claro, cubierta de pelos blancos; la planta presenta una coloración clara. Las patas traseras, presentaron una coloración clara y cubierta de pelos blancos, mientras que la planta fue de un color más oscuro, con las almohadillas más oscuras. La cola en los individuos de AI y AII presentó la parte dorsal de color oscuro, cubierta de pelos grises, mientras que la parte ventral es de color blanco crema.

- Clado B: presentó un solo patrón de coloración, el dorso generalmente de color sepia caliente oscuro, con los flancos un poco más claros, y la zona central del dorso

presentaba una línea negra, en algunos especímenes el dorso es más claro y con tonos anaranjados (Esmeraldas). El vientre presentó una coloración gris blancuzca, en algunos especímenes el vientre era más cenizo u oscuro (Figuras 16 y 17).

La coloración de las patas delanteras fue clara con pelos blancos y la planta presentó la misma coloración; mientras que las patas traseras presentaron un dorso de color claro y la planta de color oscuro, con las almohadillas más oscuras. La cola fue bicolor, y cubierta de pelos grises.

- Clado C: presentó un solo patrón de coloración, con el dorso de color marrón Verona, con los flancos más claros, y con una franja más oscura en la parte media del dorso. El vientre presentó un color gris blancuzco, con un parche bien definido en la zona gular, de color amarillo marfil en el caso del subclado CII, mientras que en subclado CI el parche es poco notorio (Figuras 16 y 17).

En las patas se presentó una sola coloración, las patas delanteras presentaron el dorso de color claro, con pelos blancos cubriéndola; la planta es de color claro. Las patas traseras presentaron un dorso de color claro, igualmente con pelos blancos cubriéndola; la planta resultó de color oscuro, con las almohadillas más oscuras. La cola resultó ser bicolor en machos y hembras.

5.7 Sistemática del género *Nephelomys*

5.7.1 Relaciones filogenéticas del género *Nephelomys* en el Ecuador

Al ser el primer trabajo filogenético en el género *Nephelomys*, mis resultados ayudan a esclarecer substancialmente la taxonomía del género puesto que los estudios anteriores sobre *Nephelomys* solo incluyeron dos secuencias, de *N. albigularis* y *N. levipes* (Weksler, 2006; Percequillo *et al.*, 2011; Pine *et al.*, 2012; Alvarado y D'Elía, 2013).

En base a mis resultados se confirma que el género *Nephelomys* es parafiletico con respecto al género *Mindomys*, y que dentro del mismo género las relaciones filogenéticas no están totalmente claras; *N. levipes* se ubica como la especie más basal dentro del género; en el caso de *N. auriventer* se ha confirmado que se trata de una especie monotípica como propone Percequillo (2015), pero aún queda en duda su identidad, ya que no se pudo revisar material morfológico ni genético de los especímenes de Perú; la especie *N. nimbosus* sigue siendo una incógnita ya que no se ha podido obtener material genético hasta ahora, aunque existe un reporte reciente de especímenes encontrados por personal del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (Brito *et al.*, 2015).

En el caso de *N. moerex* se confirmaría como una especie válida, la misma estaría relacionada con *N. albigularis* (Figura 18) como lo propuso O. Thomas (1914) y Weksler y colaboradores (2006), su distribución quedaría restringida solamente a las estribaciones noroccidentales del Ecuador (Figura 19).

En base a los resultados filogenéticos y morfológicos se observa que las poblaciones del norte del Ecuador (AI, AII) no corresponden a *N. albigularis sensu stricto* (Figura 18 y 19). Existen dos posibles explicaciones, la primera que se traten de dos especies nuevas no descritas, esto es apoyado por la diferencia genética y morfológica encontrada (fosa mesopterigoidea, foramen incisivo, proceso coronoideo); la segunda sería que se tratasen

de dos especies ya descritas y reportadas solamente para Colombia (*N. childi* y *N. pectoralis*). Esto podría ser posible ya que ambas están presentes al sur de Colombia (Percequillo, 2015), y probablemente su distribución llegue hasta Ecuador. Por una falta de muestreo en la zona limítrofe de Colombia y Ecuador no existen registros de estas especies.

Se revisaron los especímenes del norte con la ayuda de la clave taxonómica del género *Nephelomys* de Percequillo (2015), pero no se pudo corroborar la segunda opción ya que los caracteres morfológicos utilizados en esta clave presentan una alta complejidad y variabilidad, por lo cual AI y AII pueden considerarse como especie candidatas no confirmadas (ECN), hasta contar con muestras genéticas de *N. childi* y *N. pectoralis*, ya que no se han hecho trabajos sobre estas dos especies, así mismo Percequillo (2003) menciona que la variación morfológica dentro de este género es muy amplia.

Mientras que las poblaciones del centro y sur (CI y CII) incluirían a dos especies, una ya descrita bajo el nombre *N. albigularis* (CII) la cual estaría distribuida al sur del Ecuador en las provincias de Bolívar, Tungurahua, Azuay, Zamora Chinchipe, Loja y El Oro, este grupo corresponde a la especie *sensu stricto* (Figuras 18 y 19), ya que para la reconstrucción filogenética se utilizaron secuencias de especímenes (QCAZ-M 9875, 9876, 9878) colectados en la provincia de Bolívar en la localidad de Chillanes “Bosque de Tiquibuzo”, cerca (15 km) a la localidad tipo Pallatanga en la provincia de Chimborazo (Tomes, 1860); también se usó secuencias de un espécimen colectado en Perú en el departamento de Cajamarca en la localidad Las Ashitas, esta secuencia se ubicó dentro del subclado CII, razón por la cual se sugiere que *N. albigularis sensu stricto* también está en el norte de Perú (Percequillo, 2015); mientras que el grupo CI sería una especie candidata confirmada (ECC), la cual se encontraría restringida a las estribaciones centro sur

orientales del Ecuador, en las provincias de Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Figura 19).

Mindomys hammondi al parecer sería una especie más dentro del género *Nephelomys*, y estaría relacionada con *N. auriventer* (Figura 3), esto contradice los resultados de los trabajos de Weksler (2006), quien ubica a *M. hammondi* dentro del género *Oecomys* en base a caracteres morfológicos y el gen nuclear IRBP, mientras que Percequillo y colaboradores (2011), ubican a *M. hammondi* entre el género *Oecomys* e *Hylaeamys* en base al gen Cytb y el gen IRBP, finalmente Pine y colaboradores (2012) ubican a *M. hammondi* dentro del género *Euryoryzomys* en base al gen Cytb, IRBP y 12 S; por lo cual debe realizar un análisis morfológico más detallado, y comparar con los especímenes del material tipo, ya que de estar en lo correcto se debería transferir a la especie *M. hammondi* dentro del género *Nephelomys* para de esta forma recuperar la monofilia del género.

5.7.2 Filogeografía de las especies del género *Nephelomys* en el Ecuador

Al observar los resultados filogenéticos y la distribución de los mismos, se sugiere que las especies del género *Nephelomys* en Ecuador se originaron por un proceso de especiación alopátrica. Debido a la formación de barreras (levantamiento de los Andes) las poblaciones ancestrales quedaron aisladas por largo tiempo, (Anexo 6a, Lomolino *et al.*, 2010). Este modelo de especiación ha sido propuesto en varios trabajos sobre roedores (Patton, 1986; Smith y Patton, 1992, 1993, 1999; Weksler, 2006; Smith y Patton, 2007; Gerald *et al.*, 2008, Percequillo *et al.*, 2011; Parada *et al.*, 2012; Pine *et al.*, 2012), además de otros vertebrados como lagartijas (Torres-Carvajal, 2007), aves (Kattan *et al.*, 2011) y anfibios (Dos Santos *et al.*, 2015).

Al tomar en cuenta este escenario tanto los clados A, B y C, como los subclados AI y AII se encuentran separados por las vertientes occidentales y orientales de la cordillera de

los Andes que estarían actuando como barreras geográficas. En primer lugar el levantamiento de los Andes del norte durante pleistoceno temprano (hace cinco millones de años) provocó la separación de las formas de roedores de tierras bajas y montañas (Anexo 7, Parada *et al.*, 2013; Prada *et al.*, 2014), en este caso se puede corroborar al observar la relación entre: [((*Oecomys-Euryoryzomys*)*Nephelomys*)*Handleyomys*]. Los géneros exclusivos de tierras bajas (*Oecomys* y *Euryoryzomys*) se encuentran agrupados en un mismo clado, mientras que los géneros montanos (*Nephelomys* y *Handleyomys*) se encuentran separados (Figura 4).

Esto coincide con la etapa de mayor actividad durante el levantamiento de los Andes del norte de 7 a 2,5 millones de años (Hoorn *et al.*, 2010). Este evento geológico provocó que la topografía del suelo genere formaciones geológicas (cordilleras) que actuaron como barreras geográficas; así mismo, la baja capacidad de dispersión (vagilidad) de los roedores y las barreras ya formadas pudieron haber favorecido el aislamiento (Lomolino *et al.*, 2010; Novillo y Ojeda *et al.*, 2012).

Mientras que los subclados CI y CII igualmente pudieron haber sufrido un proceso de especiación alopátrica. Este modelo no contempla barreras físicas, sino interacciones ecológicas como la competencia interespecífica específicamente la exclusión competitiva, en la cual dos especies ecológicamente similares son incapaces de coexistir debido a la exclusión del competidor inferior (Hardin, 1960). El proceso que pudo ocurrir se conoce como intrusión, en este caso la competencia de dos especies (a y b) provocaría la separación de la especie “a” en dos poblaciones competidores aptos (a^1) y competidores inferiores (a^2), con la presencia de la especie “b” entre estas dos subpoblaciones (Anexo 6b, Gutiérrez *et al.*, 2014). En el caso entre CI y CII se puede especular que las poblaciones ancestrales pudieron haber sufrido un proceso de intrusión por parte de otra especie roedor que provenía el cual podía pertenecer al linaje de los roedores oryzominos y

estar relacionado con *Nephelomys*, y de esta forma empezar a competir por un mismo recurso que en el caso de los roedores es el alimento (Reig, 1986). Una vez ocurrida la separación, los competidores inferiores pudieron encontrar otro tipo de dieta como: flores, frutos, semillas, raíces, larvas de insectos (Belkis, 1997), este cambio en la dieta pudo ser el causante de las diferencias en la morfología de las estructuras relacionadas con la masticación, ubicadas en el cráneo y la mandíbula (Figura 13 y 14).

Este modelo de especiación también pudo verse reforzado por los eventos paleogeográficos que se dieron durante el pleistoceno. Estos eventos provocaron que se formen parches de vegetación que actuaron como refugios, y favorecieron la competencia (Schubert y Vivas, 1993; Rivas y Péfaur, 1999b).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El complejo “*albigularis*” en Ecuador está conformado por cinco grupos AI, AII, B, CI, CII; de los cuales AI y AII son considerados como especies candidatas no confirmadas (ECN), hasta que se realice una comparación con las especies de Colombia (*N. childi* y *N. pectoralis*), mientras que CI se puede considerar como especie candidata confirmada (ECC).

Las especies *N. albigularis* (CII) y *N. moerex* (B) forman linajes evolutivos independientes, por lo cual se confirman como especies válidas.

Los linajes de estribaciones orientales (CI) y occidentales (B-*N. moerex*) son endémicos del Ecuador.

El bajo grado de diferenciación morfométrica y la complejidad morfológica encontrada, permitió determinar que *Nephelomys albigularis* se trata de un complejo de especies crípticas.

Los resultados filogenéticos revelaron que *Nephelomys albigularis sensu stricto* se restringe a la parte sur oriental del Ecuador.

Al parecer las especies del género *Nephelomys* pudieron sufrir un proceso de especiación alopátrica, ocasionado por barreras biogeográficas e interacciones ecológicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agrellos, R., Bonvicino, C. R., Rosa, E. S., Marques, A., D'Andrea, P. S., Weksler, M. 2012. The taxonomic status of the Castelo dos Sonhos Hantavirus reservoir, *Oligoryzomys utiaritensis* Allen 1916 (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae). *Zootaxa* 3220:1–28.

Alvarado, D. F., D'Elia, G. 2013. A new genus for the Andean mice *Akodon latebricola* and *A. bogotensis* (Rodentia: Sigmodontinae). *Journal of Mammalogy* 94(5):995-1015.

Belkis, R. 1997. Características morfológicas y ecológicas de *Oryzomys albigularis* (Rodentia: Muridae) para Venezuela. *Sociedad de Ciencias Naturales La Salle* 77(147):3-13.

Bickford, D., Lohman, D., Sodhi, N., Peter, K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K., Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22:148-155.

Bonvicino, C., Moreira, M. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Oryzomys* (Rodentia: Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18:282–292.

Borisenko, A., Lim, B., Ivanova, N., Hanner, R., Hebert, P. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources* 8:471–479.

Bradley, R. D., Baker, R. J. 2001. A test of the genetic species concept: Cytochrome-b sequences and Mammals. *Journal of Mammalogy* 82(4):960-973.

Bradley, R. D., Henson, D. D., Durish, D. 2008. Re-evaluation of the geographic distribution and phylogeography of the *Sigmodon hispidus* complex based on mitochondrial DNA sequences. *National Institutes of Health (NIH)* 53(3):301–310.

Brito, J., Tinoco, N., Sornoza, F. 2015. New distributional record of endemic *Nephelomys nimbosus* mouse (Rodentia: Cricetidae) in southeastern Ecuador. *Therya* 6(3):671-678.

Cabrera, A., 1961. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista Del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernadino Rivadavia. Zoologia* 4(2):309-732.

Carroll D.S., Bradley R.D. 2005. Systematics of the genus *Sigmodon*: DNA sequences from beta fibrinogen and cytochrome b. *The Southwestern Naturalist* 50(3):342-349.

Catzefflis, F., Tilak. M. 2009. Molecular systematic of Neotropical spiny mice (*Neacomys*: Sigmodontinae, Rodentia) from the Guianan Region. *Mammalia* 73:239–247.

Costa, B., Geise, L., Pereira, L., Costa, L. 2011. Phylogeography of *Rhipidomys* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) and description of two new Species from southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy* 249:945–962.

Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*

85:407–416.

D’Elia, G. 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics* 19:307–323.

D'Elía, G., Luna, L., González, E., Patterson, B. 2006. On the Sigmodontinae radiation (Rodentia, Cricetidae): An appraisal of the phylogenetic position of *Rhagomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:558–564.

D'Elía, G., Pardiñas, U. F., Jayat, J. P., Salazar-Bravo, S. 2008. Systematics of *Necromys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): species limits and groups, with comments on historical biogeography. *Journal of Mammalogy* 89:778-790.

D'Elía, G., Teta, P., Upham, N. S., Pardiñas, U., Patterson, B., 2015. Description of a new soft-haired mouse, genus *Abrothrix* (Sigmodontinae), from the temperate Valdivian rainforest. *Journal of Mammalogy* 96:839-853.

Drummond, A.J. y Rambaut, A. 2009. Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. En: (P. Lemey, P., Salemi, P., y Vandamme, A (Eds.). *The Phylogenetic Handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing* 564-591p. 2da Edición. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

Funk, C., Carminer, M., Ron, S. 2011. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceeding. The Royal Society Biological Sciences* 1471-2954.

Geraldes, A., Basset, P., Gibson, B., Smith, K., Harr, B., Yu, H. T., Bulatova, N., Ziv, Y., Nachman, M. W. 2008. Inferring the history of speciation in house mice from autosomal, X-linked, Y-linked and mitochondrial genes. *Molecular Ecology* 17(24): 5349-5363.

Guisande, C., Vaamonde, A., Barreiro, A. 2014. *Estadística con R. V 1.0*. Universidad de Vigo, Vigo, España. 35p.

Gutiérrez, E., Boria, R. A., Anderson, P. 2014. Can biotic interactions cause allopatry? Niche models, competition, and distributions of South American mouse oposums. *Ecography* 37:741–753.

Hair, J. F., Tatham, R. L., Anderson, R. E., Black, W. 1998. *Multivariate Data Analysis*, Prentice Hall, New Jersey. 587p

Hanson, J. D., Bradley, R.D. 2008. Molecular diversity within *Melanomys caliginosus* (Rodentia: Oryzomyini): evidence for multiple species. *Occasional Papers the Museum Texas Tech University* 275:1–11.

Hanson, J. D., Utrera, A., Fulhorst, C. F. 2011. The delicate pygmy rice rat (*Oligoryzomys delicatus*) is the principal host of Maporal virus (Family Bunyaviridae, genus *Hantavirus*). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11:691–696.

Hanson, J. D., D'Elía, G., Ayers, S., Cox, S., Burneo, S., Lee, T. 2015. A new species of fish-eating rat, genus *Neusticomys* (Sigmodontinae), from Ecuador. *Zoological Studies* 54:49.

Hamilton, C.A., Formanowicz, D.R., Bond, J.E. 2011. Species delimitation and phylogeography of *Aphonopelma hentzi* (Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae): cryptic diversity in North American tarantulas. *PLoSOne* 6(10): 26207.

Hardin, G. 1960. The competitive exclusion principle. *Science* 131:1292–1297.

Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzens, D. H., Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101(41):14812–14817.

Henson, D., Bradley, R. 2009. Molecular systematics of the genus *Sigmodon*: results from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Canadian Journal of Zoology* 87(3):211-220.

Hershkovitz, P., 1944. A systematic review of the Neotropical water rats of the genus *Nectomys* (Cricetinae). Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan. 58:1-88.

Henson, D., Bradley, R. 2009. Molecular systematics of the genus *Sigmodon*: results from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Canadian Journal of Zoology* 87(3):211-220.

Huelsenbeck, J. y Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8):754-755.

Irwin, D. M., Kocher, T. D., Wilson, A. C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32(2):128-144.

Jansa, S. A., Weksler, M. 2004. Phylogeny of muroid rodents: relationships within and among major lineages as determined by IRBP gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:256–276.

Jayat, J. P., Ortiz, P. E., Pardiñas, U. F. J., Salazar-Bravo, J., D'Elía, G. 2010. The *Akodon boliviensis* species group (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in Argentina: species limits and distribution, with the description of a new entity. *Zootaxa* 2409:1–61.

Kattan, G. H., Franco, P., Rojas, V., Morales, G. 2004. Biological diversification in a complex region: a spatial analysis of faunistic diversity and biogeography of the Andes of Colombia. *Journal of Biogeography* 31(11):1829–1839.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W. Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29(6):1695-1701.

Lessmann, J. Arrivillaga, J., Aguilera, M. 2011. Caracterización molecular de poblaciones venezolanas de *Sigmodon hirsutus* (Rodentia: Cricetidae). *Revista de Biología Tropical* 59(2):795-807.

Krebs, J. Lewin, B. Goldstein, E. Killpatrick, S. 2013. *Lewin's Genes XI*. Jones & Bartlett Publishers. 940p.

Lomolino, M., Riddle, B., Whittaker, R., Brown, J. 2010. *Biogeography*. 4th Edition. Sinauer Associates Incorporated. 878p.

Lovette, I., Arbogast, B., Curry, R., Zink, R., Botero, C., Sullivan, J., Talaba, A., Harris, R., Rubenstein, D., Ricklefs, R., Bermingham, E. 2012. Phylogenetic relationships of the mockingbirds and thrashers (Aves: Mimidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63:219–229.

Machado, L. F., Leite, Y. L. R., Christoff, A. U., Giugliano L. G. 2013. Phylogeny and biogeography of tetralophodont rodents of the tribe Oryzomyini (Cricetidae: Sigmodontinae). *Zoologica Scripta* 43(2):119–130.

Masters, B., Fan, V., Ross, H. 2010. *Species Delimitation Plugin Manual V1.03*. Bioinformatics Institute University of Auckland. Auckland. Nueva Zelanda. 6p.

Miranda, G. 2007. *Relações filogenéticas entre as espécies de roedores sul-americanos da tribo Oryzomyini analisadas pelos genes citocromo B e IRBP*. Tesis Doctoral. Universidad Federal de Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Brasil. 167p.

Moreno, P. 2009. Micromamíferos. PP: 61-80 en: MECN. 2009. Guía de Campo de los Pequeños Vertebrados del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ). Publicación Miscelánea N° 5. Serie de Publicaciones del Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN)- Fondo Ambiental del MDMQ, 1-89p. Imprenta Nuevo Arte. Quito-Ecuador.

Musser, G., Carleton, M. 1993. Family Muridae. En: Wilson, D., Reeder, D. (Eds.). Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference. 2da Edición. Washington D.C. Smithsonian Institution Press. 501-755p.

Musser, G., Carleton, M. 2005. Superfamily Muroidea. En: Wilson, D., Reeder, D. (eds.) Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference. 3ra Edición. Johns Hopkins University Press, Baltimore. 894- 1531p.

Novillo, A., Ojeda, R. 2012. Diversity and distribution of small mammals in the South American Dry Andes. *Austral Ecology* 37:758–766.

Pacheco, V. 2003. Phylogenetic analyses of the Thomasomyini (Muroidea: Sigmodontinae) based on morphological data. Tesis Doctoral, The City University of New York, New York, U.S.A. 398p.

Parada, A., Pardiñas, U F., Salazar-Bravo, J., D'Elia, g., Palma, E. 2013. Dating an impressive Neotropical radiation: Molecular time estimates for the Sigmodontinae (Rodentia) provide insights into its historical Biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66:960–968.

Palma, R. E., Rodríguez-Serrano, E., Rivera-Milla, E., Hernández, C. E., Salazar-Bravo, J., Carma, M.I., Belmar-Lucero, S., Gutierrez-Tapia, P., Zeballos, H., Yates, T.L. 2010. Phylogenetic relationships of the pygmy rice rats of the genus *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia: Sigmodontinae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 160:551–566.

Patton, J. L. 1986. Patrones de distribución y especiación de la fauna de mamíferos de los bosques nublados del Perú. *Annals and Magazine of Natural History* 17(1):87-94.

Patton, J., Da Silva, M., Malcom, J. 2000. Mammals of the Rio Jurua and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 244:1-306.

Peppers, L., Bradley, R. 2000. Cryptic Species in *Sigmodon hispidus*: Evidence From DNA Sequences. *Journal of Mammalogy* 81(2):332–343.

Percequillo, A. 2003. Sistemática de *Oryzomys baird*, 1858: Definição dos grupos de espécies e revisão taxonômica do grupo *albigularis* (Rodentia, Sigmodontinae). Sin publicar. Tesis Doctoral, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil. 429p.

Percequillo, A., Weksler, M., Costa, L. 2011. A new genus and species of rodent from the Brazilian Atlantic Forest (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with comments on oryzomyine biogeography. *Zoological Journal of the Linnean Society* 161:357–390.

Percequillo, A. 2015. Genus *Nephelomys*. En Patton, J. L., Pardiñas, U. F., D'Elía, G. (eds). *Mammals of South America. Volume 2, Rodents*. The University of Chicago Press. Chicago, U.S.A. 1384p.

Pine, R., Timm, R., Weksler, M. 2012. A newly recognized clade of trans-Andean Oryzomyini (Rodentia: Cricetidae), with description of a new genus. *Journal of Mammalogy* 93:851–870.

Pough, F. H., Janis, C. M., Heiser, J. B. 2013. *Vertebrate Life*. 9th ed. Upper Saddle River. New Jersey: Prentice-Hall. 684p.

Prada, J., Brennand, P., Godoy, L., Libardi, G., Abreu-Júnior, E., Roth, P., Chiquito, E., Percequillo, A. 2014. Species richness and areas of endemism of oryzomyine rodents (Cricetidae, Sigmodontinae) in South America: an NDM/VNDM approach. *Journal of Biogeography* 42:540-551.

Prychitko, T. M., Moore, W. S. 1997. The utility of DNA sequences of an intrón from the beta-fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 8:193–204.

Prado, J., Percequillo, A. 2013. Geographic Distribution of the genera of the tribe Oryzomyini (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in South America: Patterns of Distribution and Diversity. *Arquivos de Zoologia. Museo de Zoologia da Universidade de Sao Paulo* 44(1):1-120.

Prychitko, T. M., Moore, W. S. 2000. Comparative Evolution of the Mitochondrial Cytochrome b Gene and Nuclear b-Fibrinogen Intrón 7 in Woodpeckers. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 17(7):1101–1111.

Reig, O. A. 1986. Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. En: Monasterio, M., Vuilleumier, F (Eds). *High altitude tropical biogeography*, New York: Oxford University Press 404-439p.

Renaud, S., Chevret, P., Michaux, J. 2007. Morphological vs. Molecular evolution: ecology and phylogeny both shape the mandible of rodents. *Zoologica Scripta* 36 (5):525–535.

Richter, M. H., Hanson, J. D., Cajimat, M. N., Milazzo, M. L., Fulhorst, C. F. 2010. Geographical range of Rio Mamore virus (Family Bunyaviridae, genus *Hantavirus*) in association with the small-eared pygmy rice rat (*Oligoryzomys microtis*). *Vector.Borne and Zoonotic Diseases* 10:613–620.

- Ridgway, R. 1912. Color Standars and Color Nomenclature. Published by the Author. Washington D.C. U.S.A. 164p
- Rivas, B., Péfaur, J. 1999a. Variación craneana entre sexo y edad en *Oryzomys albigularis* (Rodentia: Muridae). Mastozoología Neotropical 6(1):61-70.
- Rivas, B., Péfaur, J. 1999b. Variación geográfica en poblaciones venezolanas de *Oryzomys albigularis* (Rodentia: Muridae).). Mastozoología Neotropical 6(1)47-59.
- Rosa, C. C., Flores, T., Pieczarka, J. C., Ross, R. V., Sampaio, M. I., Rissino, J. D. 2012. Genetic and morphological variability in South American rodent *Oecomys* (Sigmodontinae, Rodentia): evidence for a complex of species. Journal of Genetics 91(3):265-277.
- Rosenberg, N.A. 2007. Statistical tests for taxonomic distinctiveness from observations of monophyly. Evolution 61(2):317-323.
- Ross, H.A., Murugan, S., Li, W.L.S. 2008. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. Systematic Biology 57(2):216-230.
- Samuels, J. X. 2009. Cranial morphology and dietary habits of rodents. Zoological Journal of the Linnean Society 156:864–888.
- Sánchez, J.C. 2012. Introducción a la estadística no paramétrica y al análisis multivariado, Quito, Ecuador. 276p.
- Schubert, C., Vivas, L. 1993. Morfología periglacial: el páramo. En Schubert, C., Vivas, L. (eds). El cuaternario de la cordillera de Mérida, Andes venezolanos. Universidad de los Andes. Fundación Polar Mérida. 345p.

Slade, R. W., Moritz, C., Heideman, A. 1994. Multiple Nuclear-Gene Phylogenies: Application to Pinnipeds and Comparison with a Mitochondrial DNA Gene Phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 11(3):341-356.

Smith, M. F., Patton, J. L. 1991. Variation in Mitochondrial Cytochrome b Sequence in Natural Populations of South American Akodontine Rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Molecular Biology and Evolution* 8(1):85-103.

Smith, M. F., Patton, J. L. 1993. The diversification of South American murid rodents: Evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50(3):149-177.

Smith, M.F., Patton, J. L. 1999. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome b. *Journal of Mammalian Evolution*. 6(2):89-128.

Smith, M. F., Patton, J. L. 2007. Molecular Phylogenetics and diversification of South American grass mice, genus *Akodon*. En: Kelt, D. A., Lessa, E. P., Salazar-Bravo, J. A., Patton, J. L (Eds). *The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson*. Berkeley: University of California Publications in Zoology 134(1):827-858.

Tamura, T., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Tate, G. H. H., 1932a. The taxonomic history of the South and Central American cricetid rodents of the genus *Oryzomys*. Part 1: subgenus *Oryzomys*. *American Museum Novitates* 579:1-18.

Thomas, O. 1914. New South-American rodents. *Annals and Magazine of Natural History* 8(14):240-244.

Tirira, D. 2007. Guía de campo de los mamíferos del Ecuador. Quito: Ediciones Murciélago Blanco. Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador 6. 151p.

Tirira, D., Boada, C. 2009. Diversidad de mamíferos en bosques de Ceja Andina alta del nororiente de la provincia de Carchi, Ecuador. *Boletín Técnico* 8. Serie Zoológica 5:1-24

Tirira, D. G. 2014. Mamíferos del Ecuador: lista actualizada de especies/Mammals of Ecuador: Updapted checklist species. Versión 2014.2. Asociación Ecuatoriana de Mastozoología y Fundación Mamíferos y Conservación. Quito. <www.mamiferosdel ecuador.com> (actualización / updated: 2014-12-16).

Tomes, R. F. 1860. Notes on a third collection of Mammalia made by Mr. Fraser in the Republic of Ecuador. *Proceedings of the Zoological Society of London* 1860:260-268.

Torres-Carvajal, O. 2007. Phylogeny and biogeography of a large radiation of Andean lizards (Squamata: Stenocercus). *Zoologica Scripta* 36:311-326.

Vieites, D., Wollenberg, K., Andreone, F., Kohler, J., Glaw, F., Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *PNAS* 106(20):8267–8272.

Voss, R. S. 1988. Systematics and ecology of ichthyomyine rodents (Muroidea): Patterns of Morphological evolution in a small adaptive radiation. *American Museum of Natural History* 188(2):269-492.

Weksler, M. 2006. Phylogenetic relationships of oryzomyine rodents (Muroidea: Sigmodontinae): separate and combined analyses of morphological and molecular data. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 296:1–149.

Weksler, M., Percequillo, A., Voss, R. 2006. Ten New Genera of Oryzomyine Rodents (Cricetidae: Sigmodontinae). *American Museum Novitates*. The American Museum of Natural History 3537:1-29.

Wickliffe, J., Hoffman, F., Carroll, D., Dunina-Barkovskaya, Y., Bradley, R., Baker, R. 2003. Intrón 7 (FGB-I7) of the fibrinogen, B beta polypeptide (FGB): A nuclear DNA phylogenetic marker for mammals. *Occasional Papers. Museum of Texas Tech University* 219:1-6.

Wilson, D., Mittermeier, R. 2009. *Handbook of the Mammals of the World* Barcelona: Lynx Editions. 727p.

Woods, C. A. 1972. Comparative myology of jaw, hyoid, and pectoral appendicular regions of New and Old World hystricomorph rodents. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 147:115-198.

Woods, C. A., Howland, E. B. 1979. Adaptive radiation of Capromyidae Rodents anatomy of the masticatory apparatus. *Journal of Mammalogy* 60:95-116.

Yu, L., Peng, D., Liu, J., Luan, P., Liang, L., Lee, H., Lee, M., Ryder, O., Zhang, Y. 2011. On the phylogeny of Mustelidae subfamilies: analysis of seventeen nuclear non-coding loci and mitochondrial complete genomes. *BMC Evolutionary Biology* 11: 92.

Zhang, D., Hewitt, G. M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of population: Practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12:563-584.

Zhang, J., Kalpi, P., Pavlidis, P., Stamatakis. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29(22):2869-2876.

Zharkikh, A. y Li, W.-H. 1992. Statistical properties of bootstrap estimation of phylogenetic variability from nucleotide sequences: II. Four taxa without a molecular clock. *Journal of Molecular Evolution* 35:356-366.

Zwickl, D.J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Thesis Doctoral, University of Texas at Austin, Texas, U.S.A. 115p.

8. FIGURAS

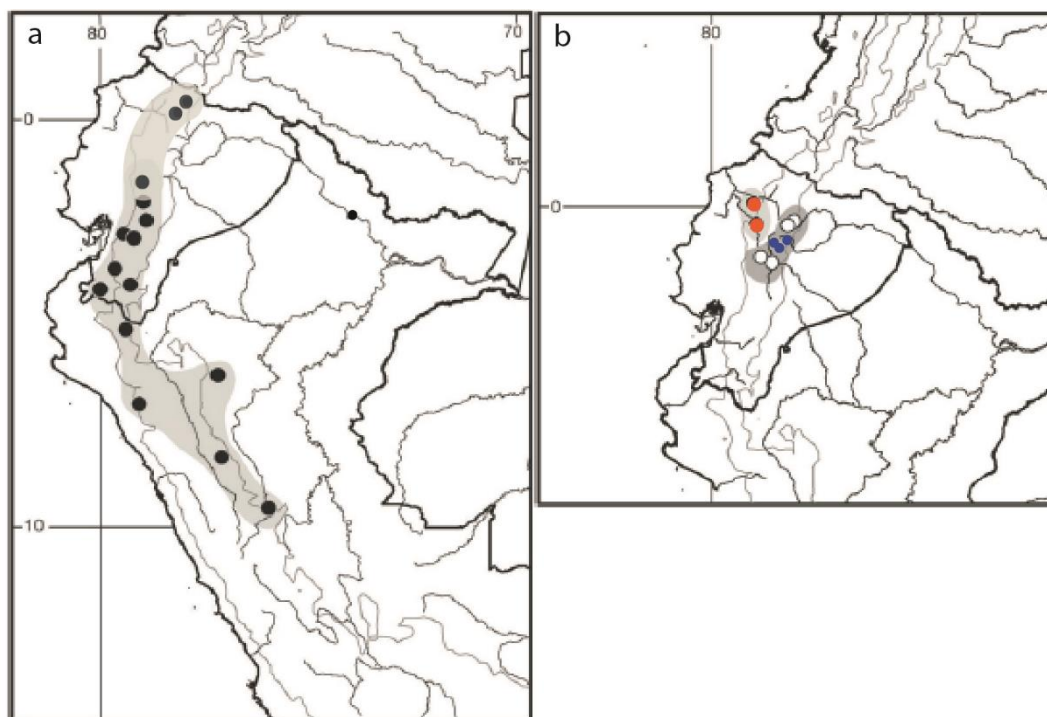


Figura 1. (a) Distribución de *Nephelomys albigularis* (negro). (b) Distribución de *Nephelomys auriventer* (azul), *Nephelomys moerex* (rojo), *Nephelomys nimbosus* (blanco). Modificado de Percequillo (2015). Las modificaciones fueron en base a registros de los Museos QCAZ-M, MECN y MEPN.

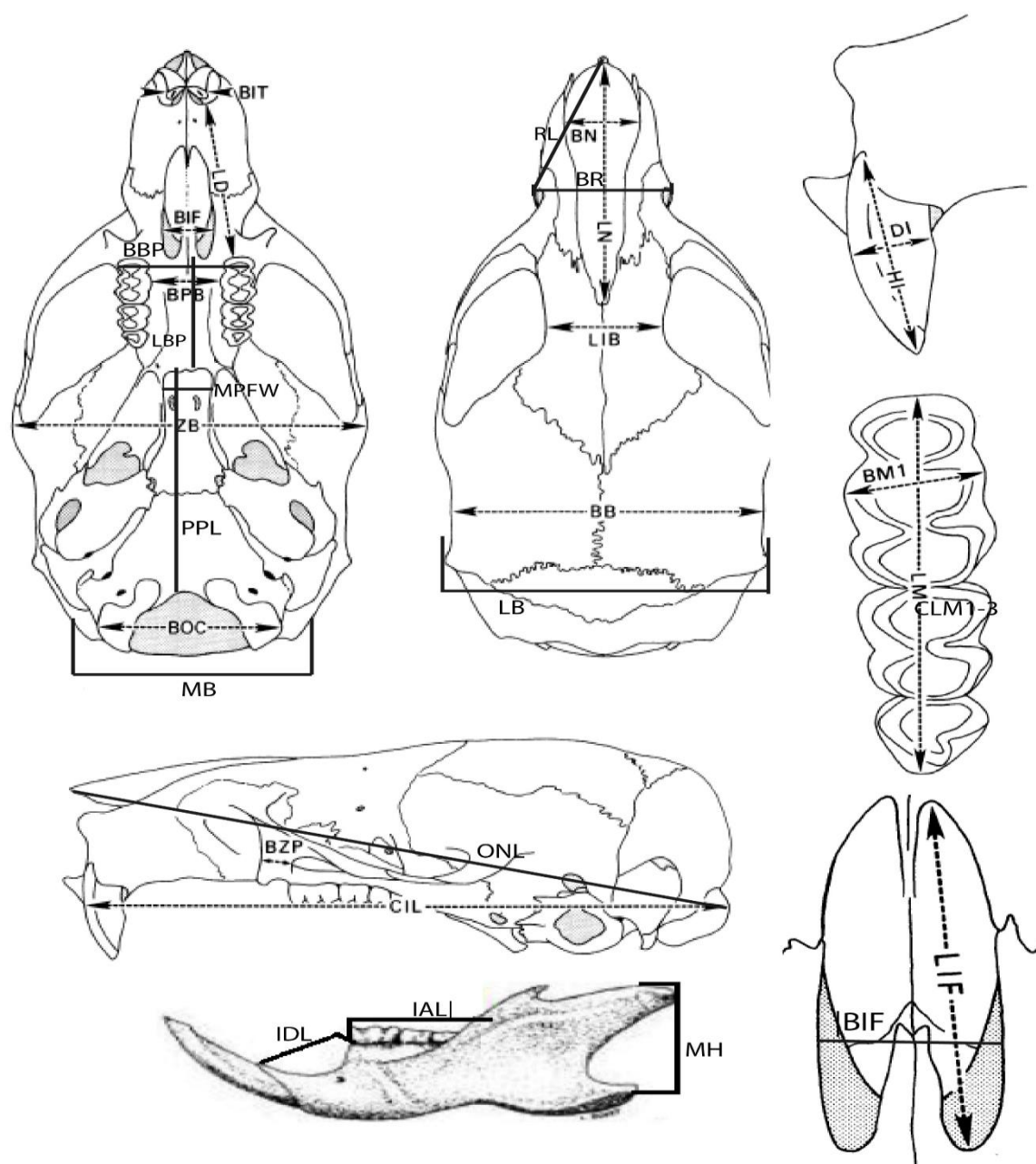


Figura 2. Medidas morfológicas tomadas en el presente estudio. BB ancho de la caja craneal, BBP ancho de la placa ósea, BIF ancho del foramen incisivo, BM 1 ancho del primer molar superior, BN ancho del nasal, BOC ancho de los cóndilos occipitales, BPB ancho del puente palatino, BR ancho del rostro, BZP ancho de la placa zigomático, CIL longitud del cóndilo incisivo, CLM 1-3 longitud oclusal de la hilera dental maxilar, DI profundidad del incisivo, HI altura del incisivo, IAL longitud oclusal de la hilera mandibular, IB ancho interorbital, IDL longitud del diastema inferior, LB ancho lamboidal, LBP longitud de la placa ósea, LD longitud del diastema, LIF longitud del foramen incisivo, LN longitud nasal, MB ancho del mastoideo, MH altura mandibular, MPFW ancho de la fosa mesopterigoidea, ONL longitud occipitonasal, PPL longitud postpalatal, RL longitud del rostro, ZB ancho del zigomático, ZIL longitud zigomática interna.

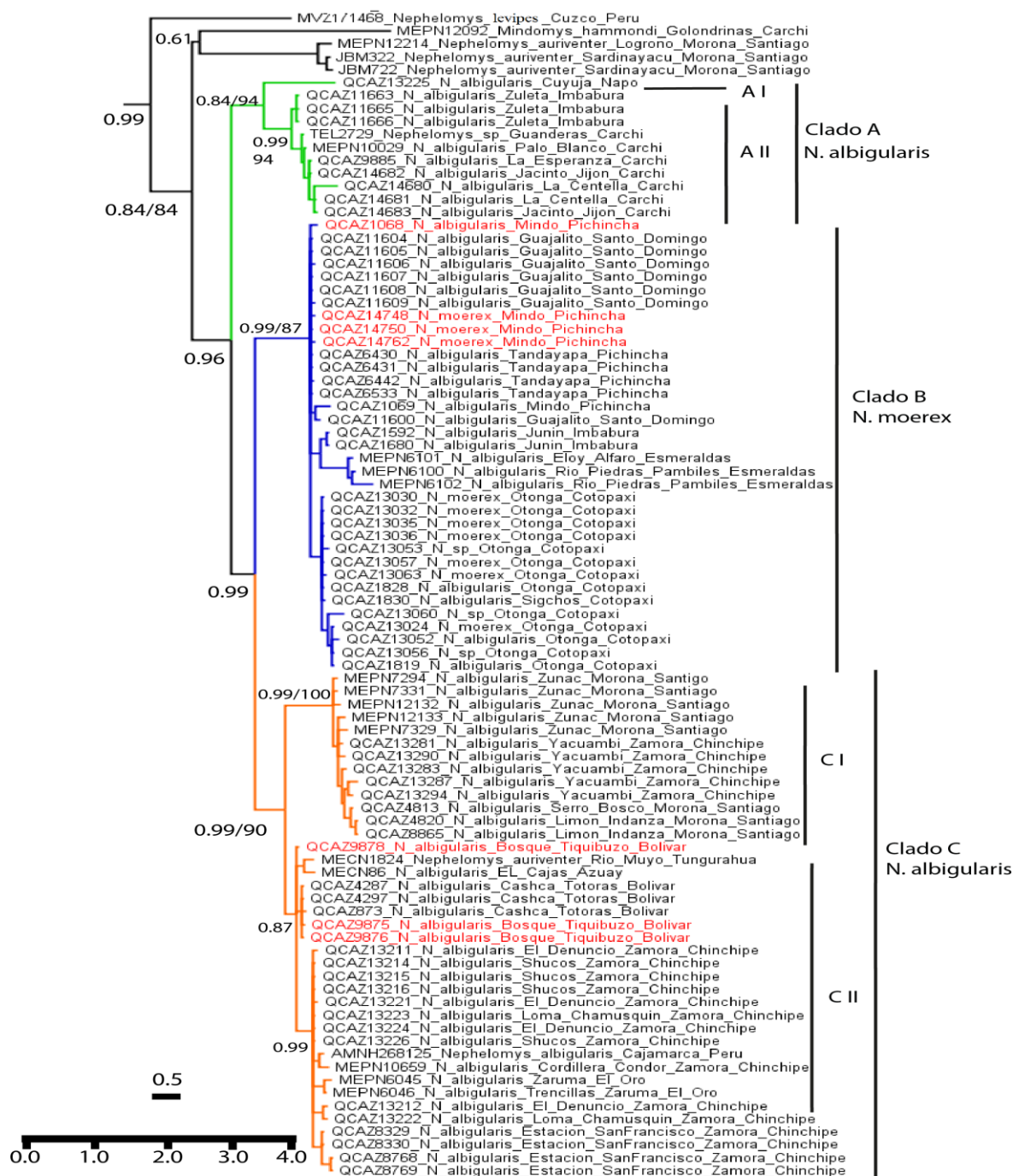


Figura 3. Filogenia de *Nephelomys* basada en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, obtenido del análisis de alrededor de 800 pb del gen mitocondrial Citocromo b. Cada secuencia está representada en los nodos terminales por el acrónimo de los museos de donde se obtuvieron las muestras (QCAZ-M, MECN, MEPN) o los números de acceso de Genbank. La escala inferior indica la longitud de las ramas. No se muestran los grupos externos. Los especímenes en rojo son especímenes de las localidades tipo o cercanas a la localidad tipo. Se muestran los valores PP > 0.90 y los valores de BP > 0.70.

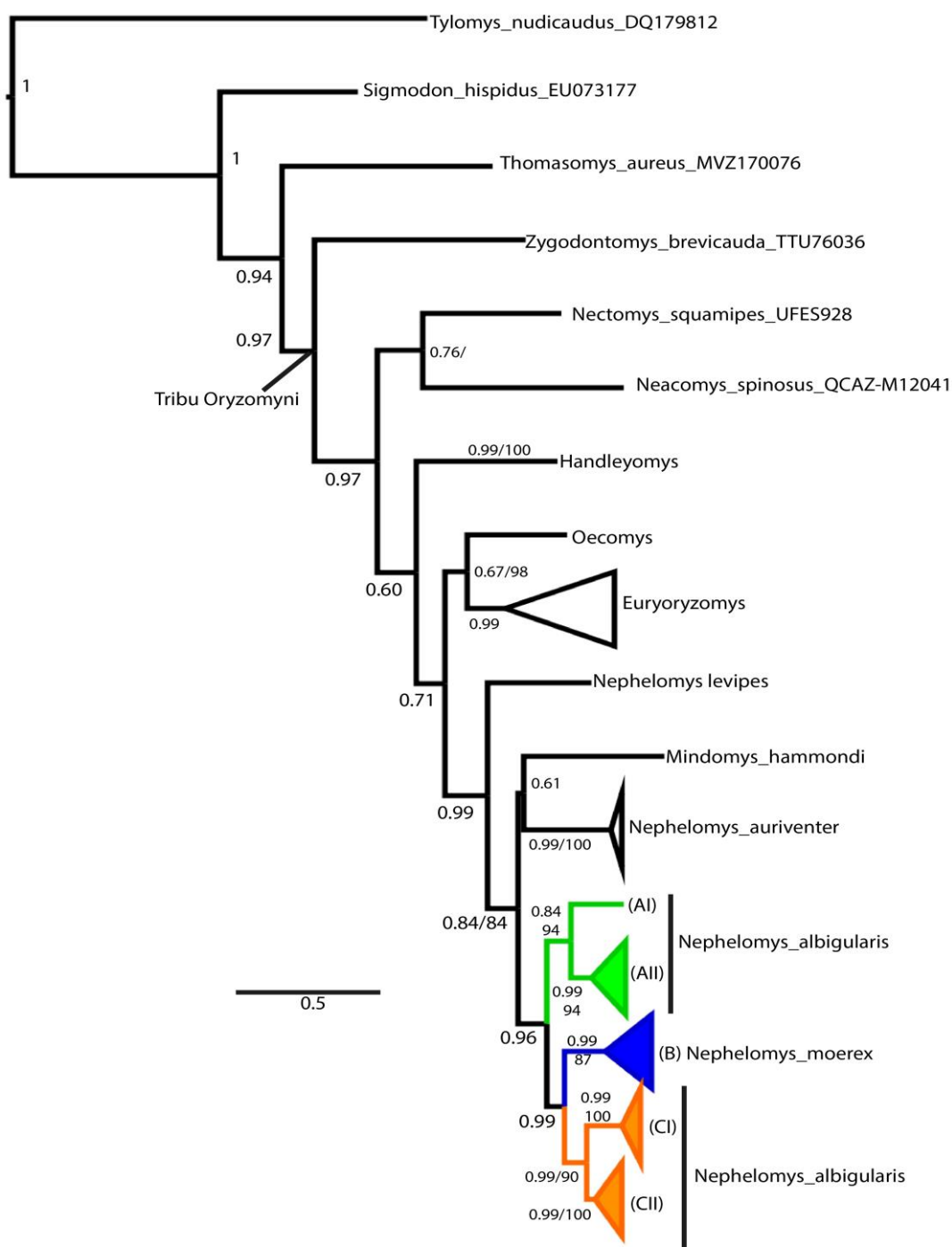


Figura 4. Filogenia de *Nephelomys*. Árbol basado en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, obtenido del análisis de alrededor de 800 pb del gen mitocondrial Citocromo b. La escala inferior indica la longitud de las ramas. *Tylomys nudicaudus*, *Sigmodon hispidus*, *Zygodontomys brevicauda*, *Thomasomys aureus*, *Oecomys catherinae*, *Euryoryzomys macconnelli*, *Handleyomys alfaroi*, *Neacomys spinosus* y *Nectomys squamipes* son los grupos externos. Los grupos filogenéticos AI, AII, B, CI, CII, se encuentran colapsados. Se muestran los valores PP > 0.90 y los valores de BP > 0.70.

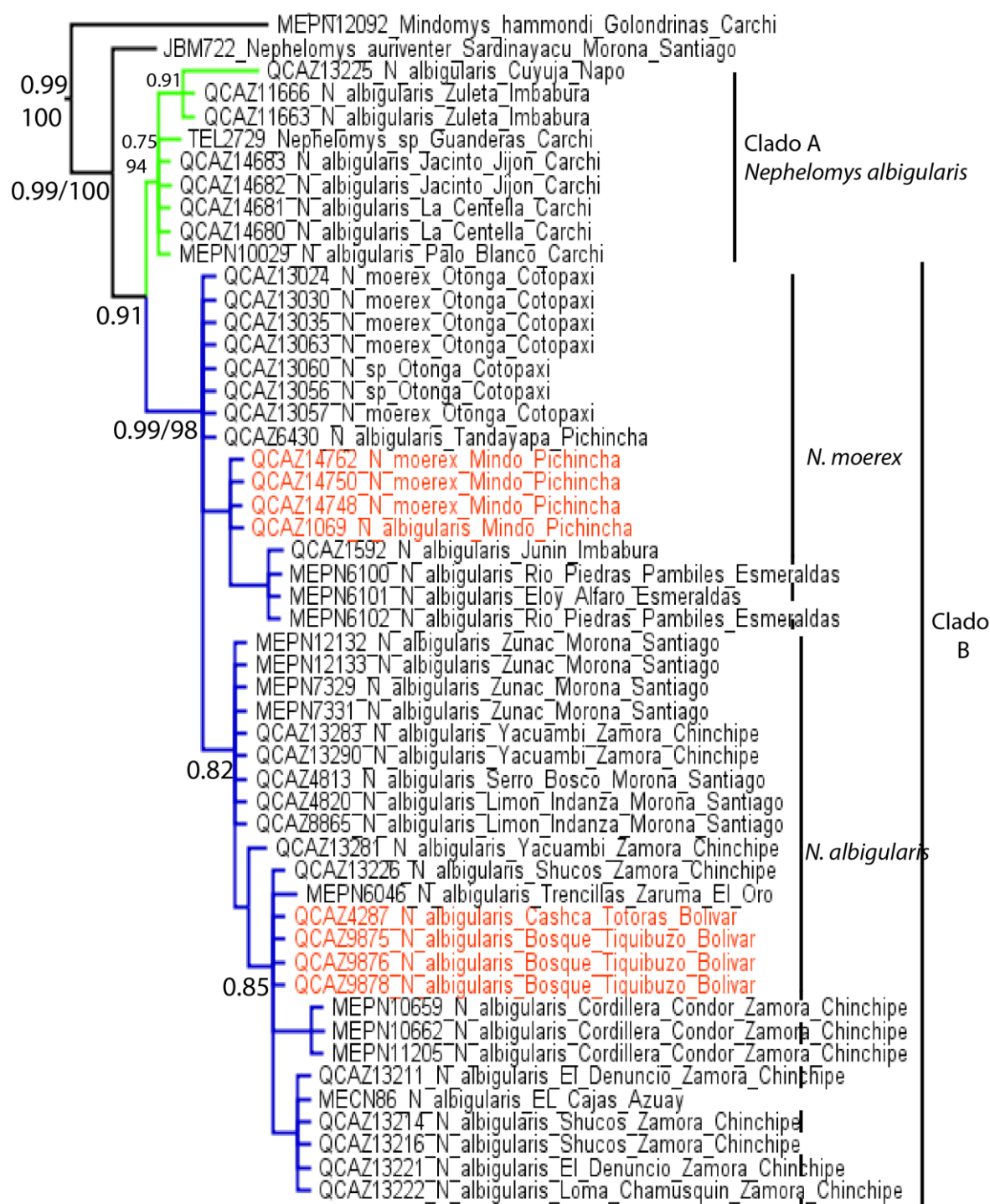


Figura 5. Filogenia de *Nephelomys*, Árbol basado en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, obtenido del análisis de alrededor de 700 pb del intrón de la cadena Beta del Fibrinógeno. No se muestran los grupos externos. Los especímenes en rojo son especímenes de las localidades tipo o cercanas a la localidad tipo. Se muestran los valores PP > 0.90 y los valores de BP > 0.70.

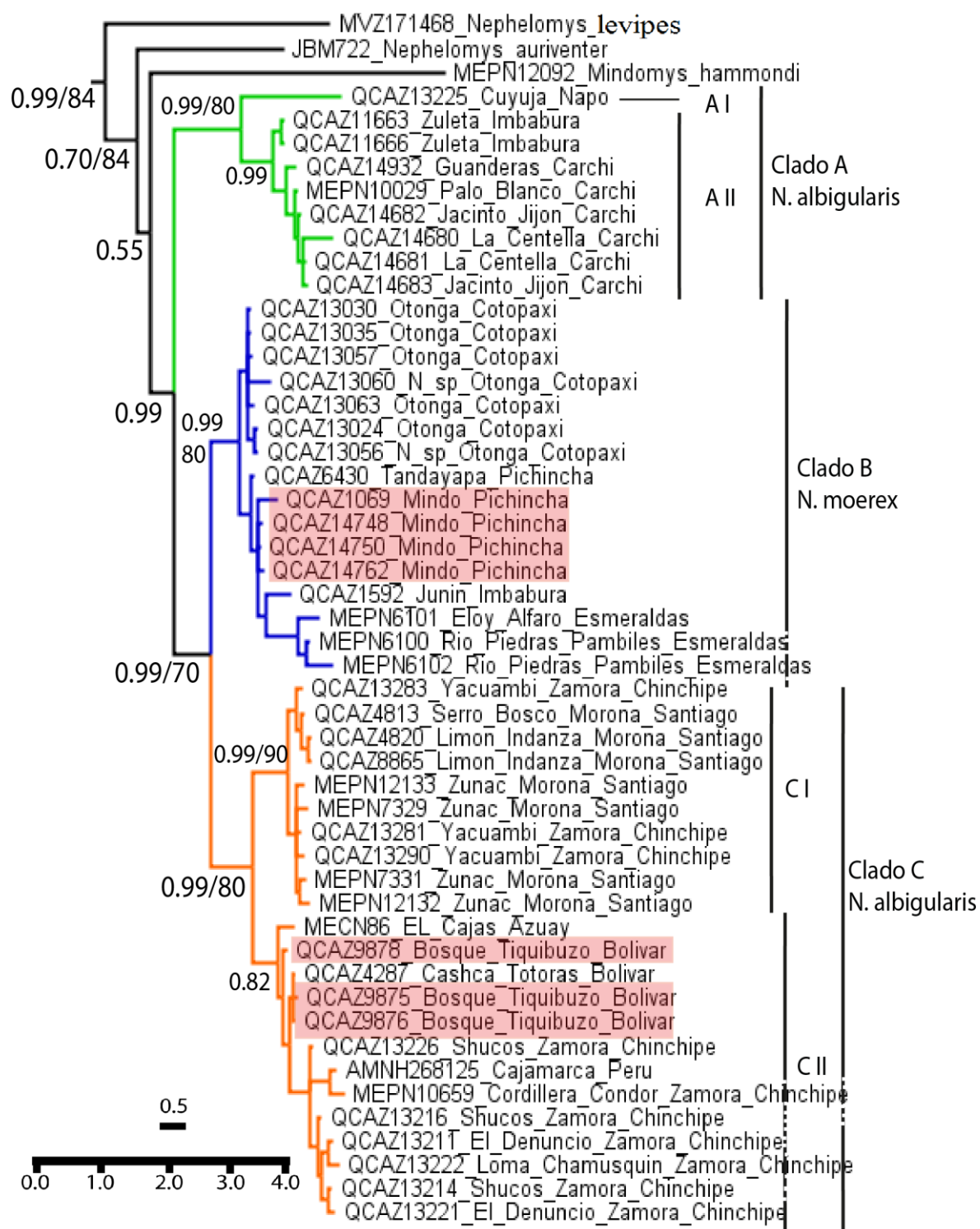


Figura 6. Filogenia concatenada de *Nephelomys*. Árbol basado en Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, obtenido del análisis de alrededor de 800 pb del gen mitocondrial Citocromo b y del intrón de la cadena Beta del Fibrinógeno de 700 pb. Los recuadros en rojo son especímenes de la localidad tipo o cercanas a una localidad tipo. La escala inferior indica la longitud de las ramas. No se muestran los grupos externos. Se muestran los valores PP > 0.90 y los valores de BP > 0.70.

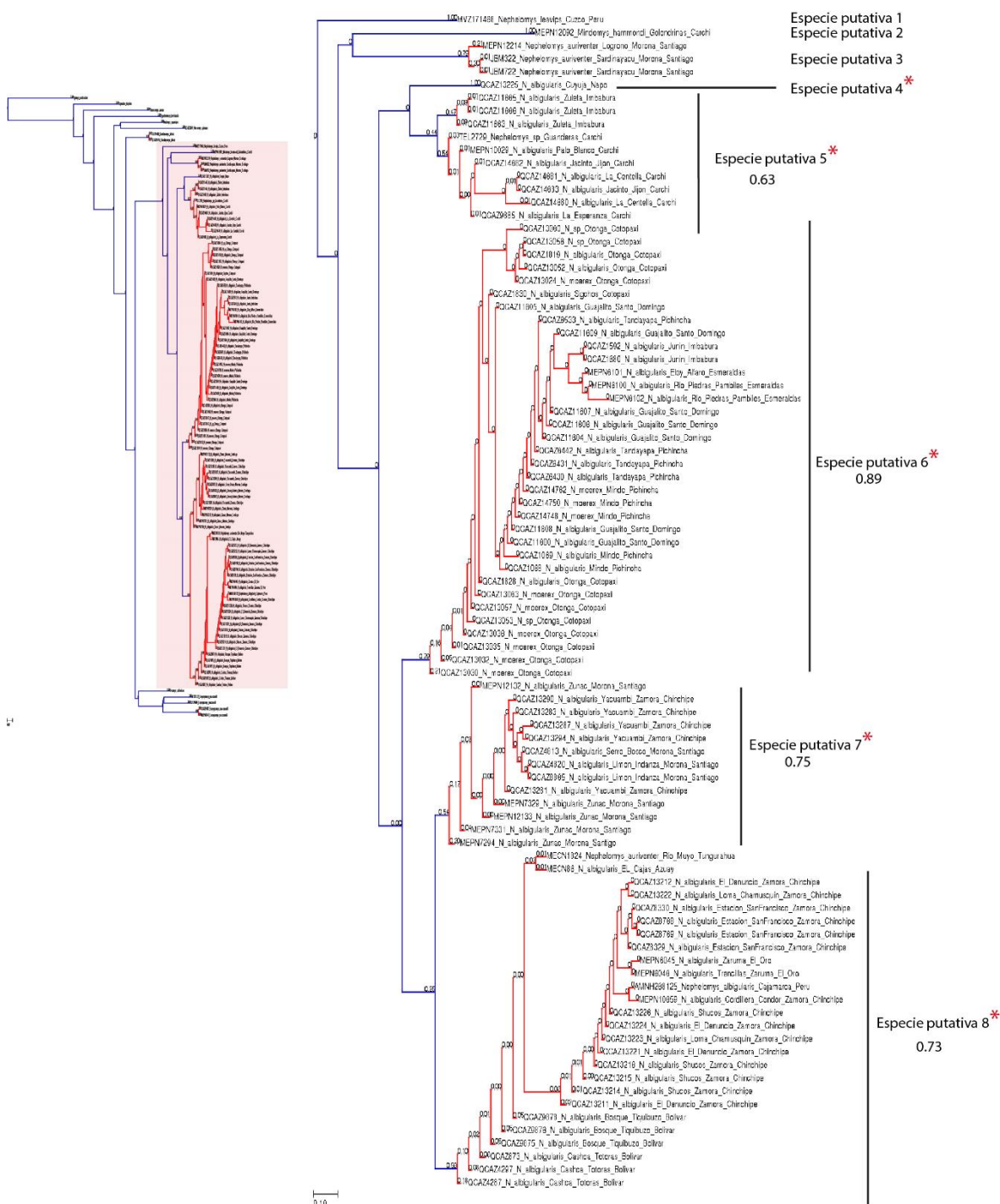


Figura 7. Delimitación de las especies putativas en base al modelo Poisson Tree Process. Filogenia de Inferencia Bayesiana en base al gen mitocondrial citocromo b. Los grupos monofiléticos en rojo indican una sola especie putativa así como las ramas terminales en azul. El modelo reconoció ocho especies putativas dentro del género *Nephelomys*. Los (*) muestran las especies putativas nuevas identificadas en este trabajo. El valor que se muestra es el valor de soporte, valores <0.90 se muestran.

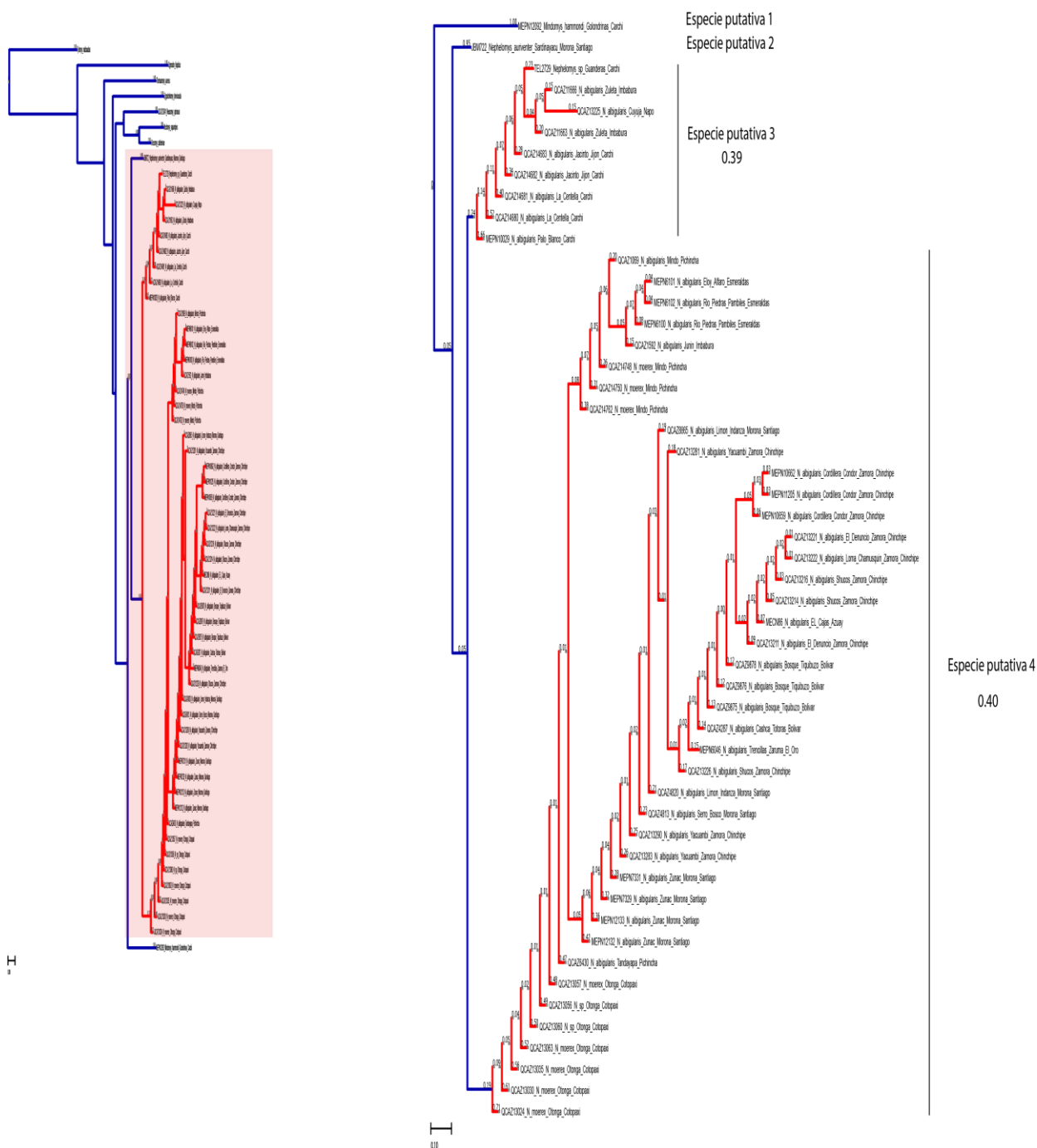


Figura 8. Delimitación de las especies putativas en base al modelo Poisson Tree Process. Filogenia de Inferencia Bayesiana en base al intrón del beta fibrinógeno. Los grupos monofiléticos en rojo indican una sola especie putativa así como las ramas terminales en azul. El modelo PTP reconoció cuatro especies putativas dentro del género *Nephelomys*. El valor que se muestra es el valor de soporte, valores <0.90 se muestran.

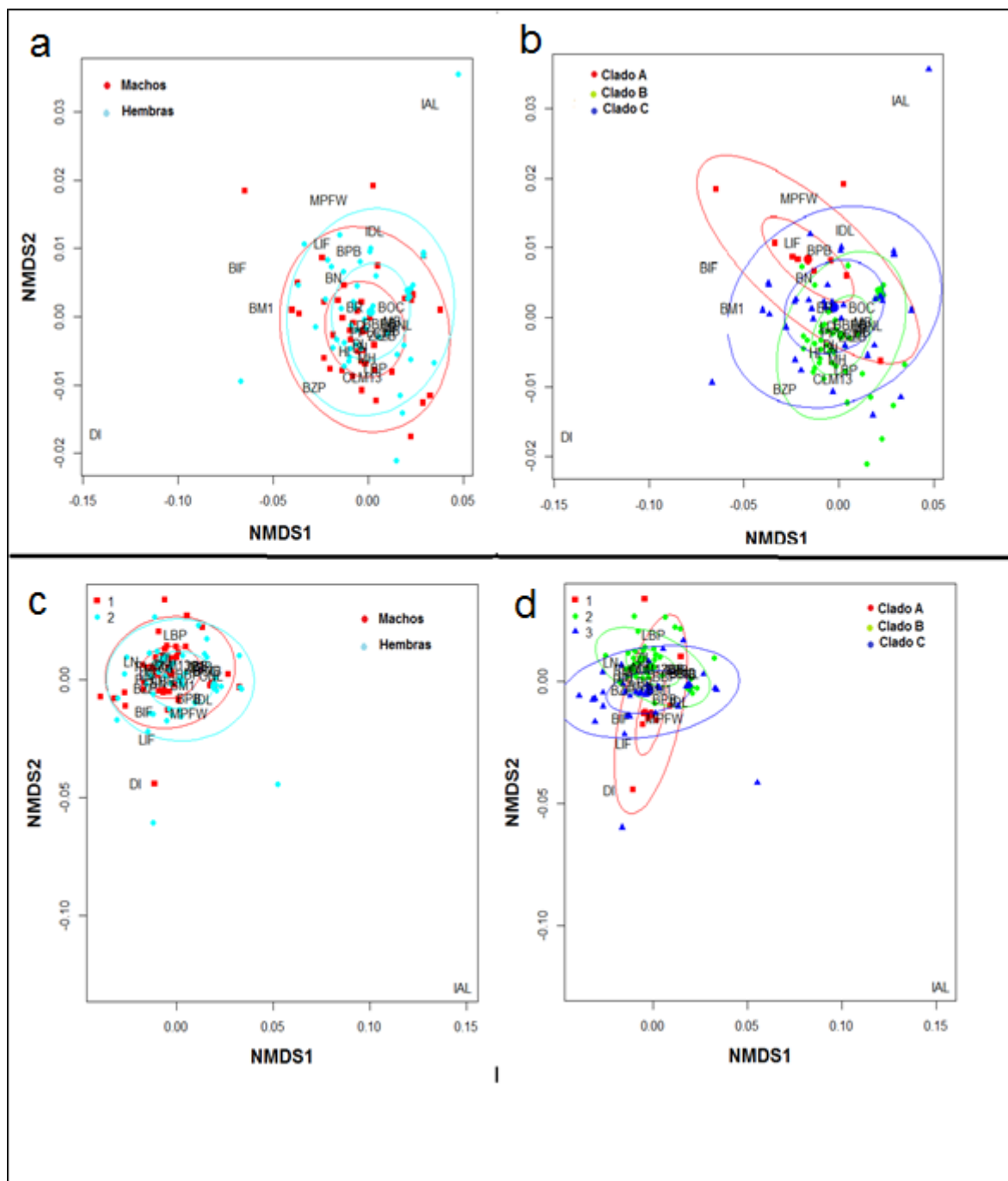


Figura 9. Análisis de Escalamiento Multidimensional obtenido a partir de las variables morfológicas de machos y hembras adultos de los clados A, B y C. Las figuras a y b muestran la similitud morfométrica entre machos y hembras, y en las figuras c y d, se muestran las similitud morfométrica entre los clados A, B y C. En las figuras a y c las medidas fueron transformadas con el logaritmo en base 10 (Lg10); mientras que las figuras b y d se eliminó el efecto del tamaño al transformar las medidas en porcentajes. Las elipses muestran los niveles de significación al 0,5 (elipse interna) y al 0,95 (elipse externa) de cada uno de los clado.

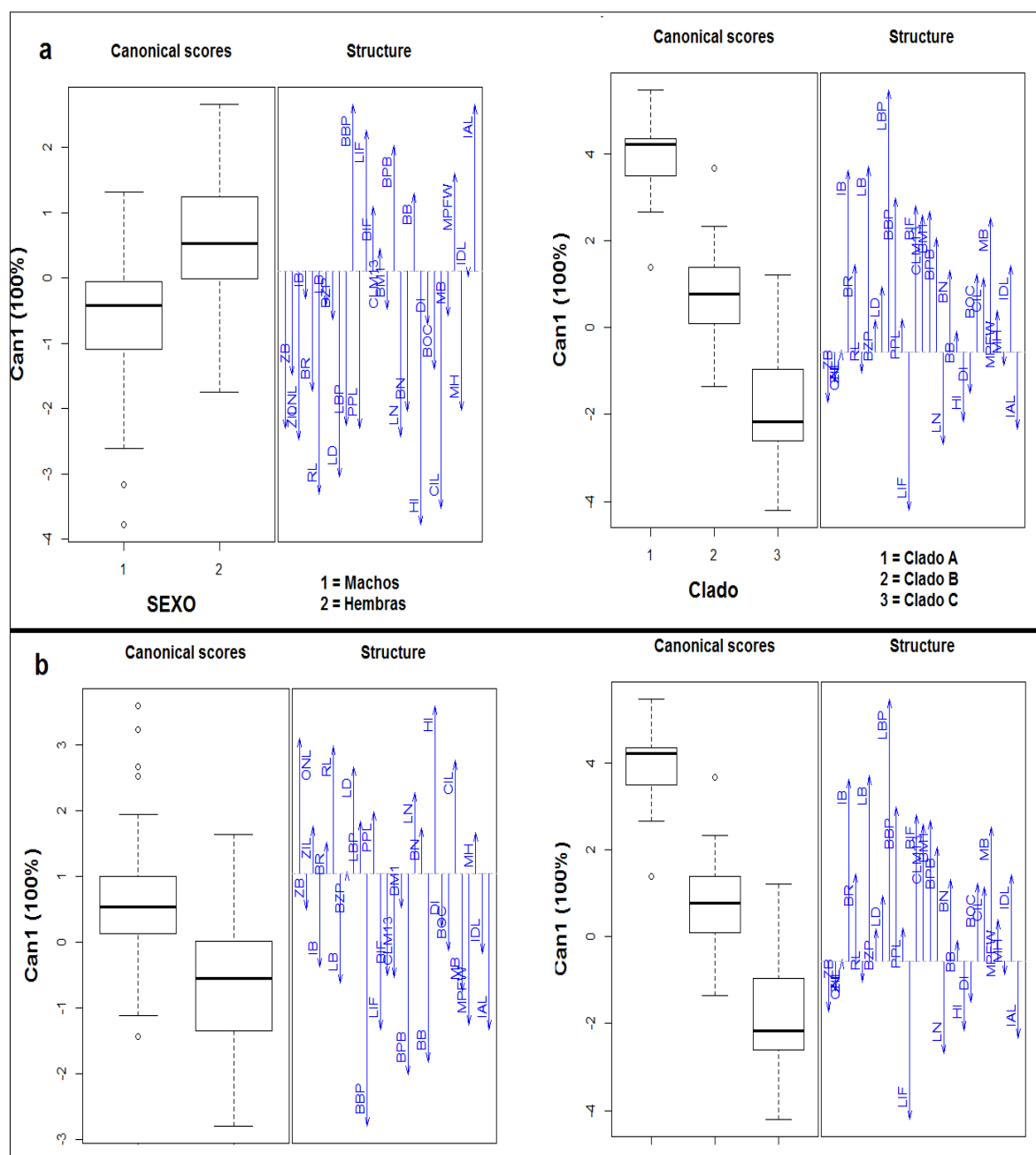


Figura 10. Análisis discriminante de las medidas de las variables morfológicas de machos y hembras adulto de los clados A, B y C. (a) medidas con transformación logarítmica en base 10 (Log10). La variabilidad entre clados se da en función de la longitud del foramen incisivo (LIF), longitud de la placa ósea (LBP), ancho del interorbital (IB) y ancho lamboidal (LB); y (b) medidas convertidas en porcentajes, para eliminar el efecto del tamaño. La variabilidad entre clados se da en función longitud de la placa ósea (LBP) y longitud del foramen incisivo (LIF).

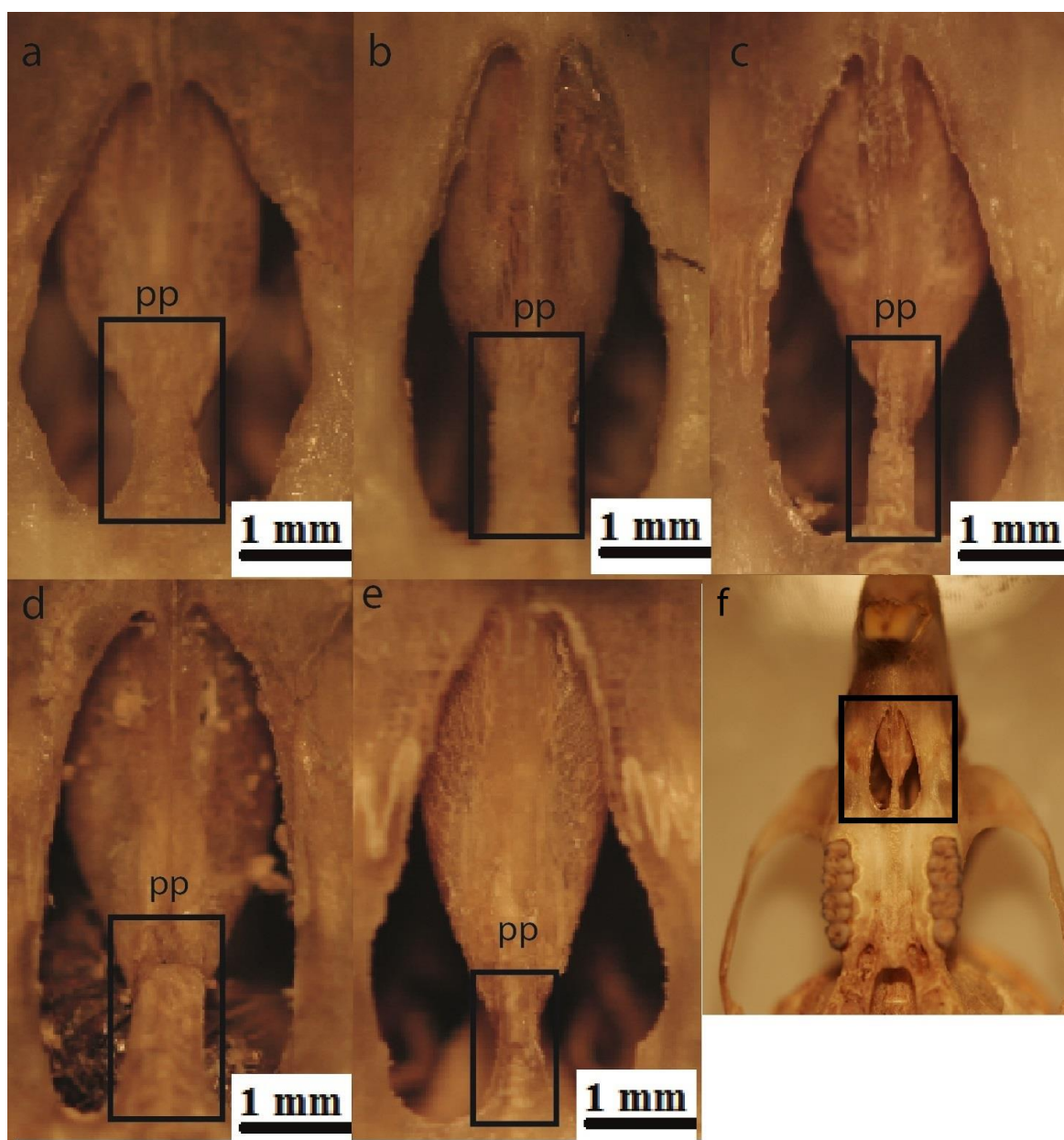


Figura 11. Vista ventral del foramen incisivo. El rectángulo señala el proceso palatino (pp). (a) QCAZ-M 13225, subclado AI. (b) QCAZ-M 14932, subclado AII. (c) QCAZ-M 14762, clado B. (d) QCAZ-M 13287, subclado CI. (e) QCAZ-M 9876, subclado CII. (f) vista ventral del cráneo, el recuadro señala la ubicación de foramen incisivo.

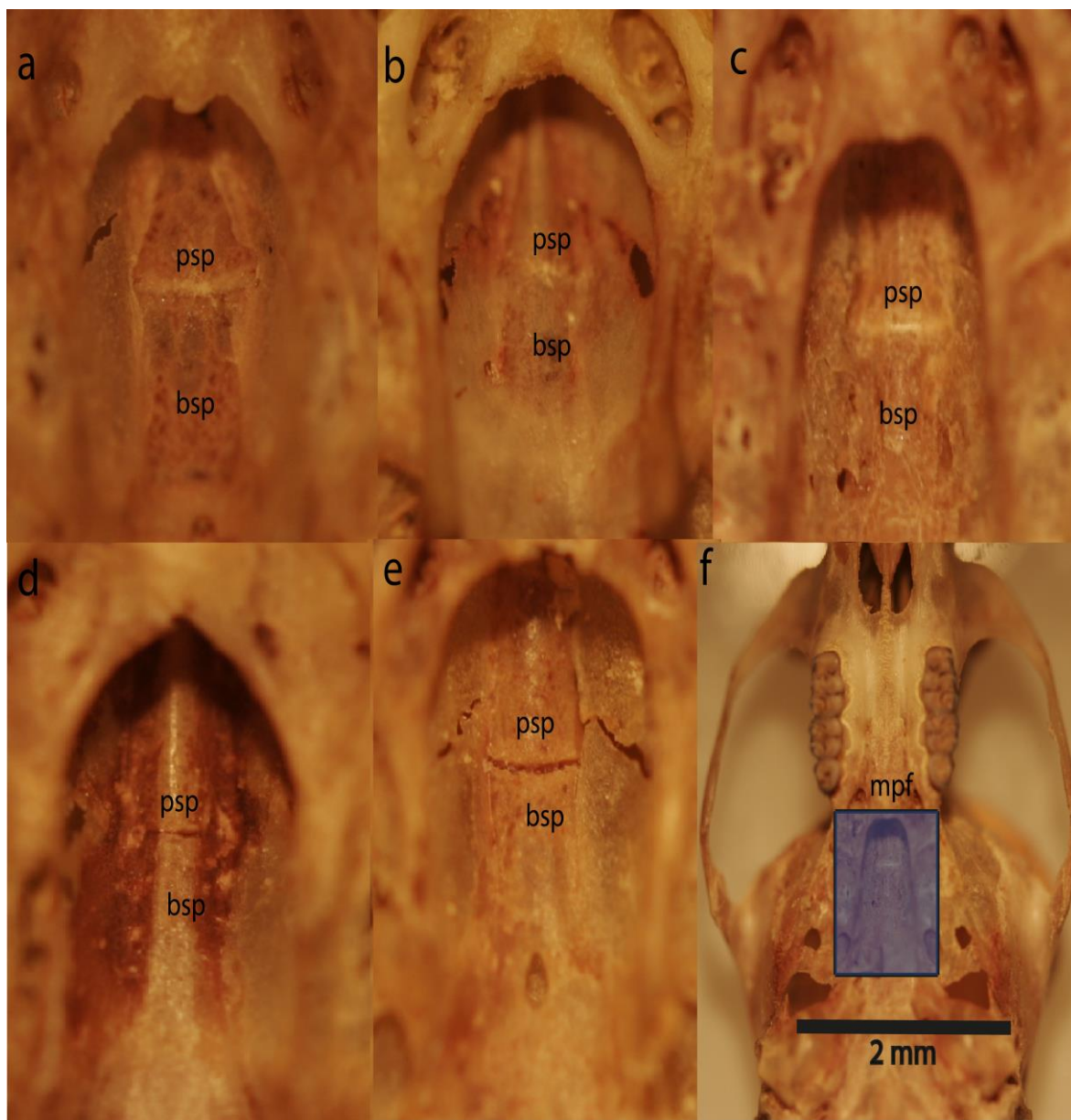


Figura 12. Vista ventral de la fosa mesopterigoidea. Fosa mesopterigoidea (mpf), presfenoide (psp), basisfenoide (bsp). (a) QCAZ-M 13225, subclado AI. (b) QCAZ-M 14932, subclado AII. (c) QCAZ-M 14762, clado B. (d) QCAZ-M 13287, subclado CI. (e) QCAZ-M 9876, subclado CII. (f) vista ventral del cráneo, el recuadro señala la ubicación de la fosa mesopterigoidea.

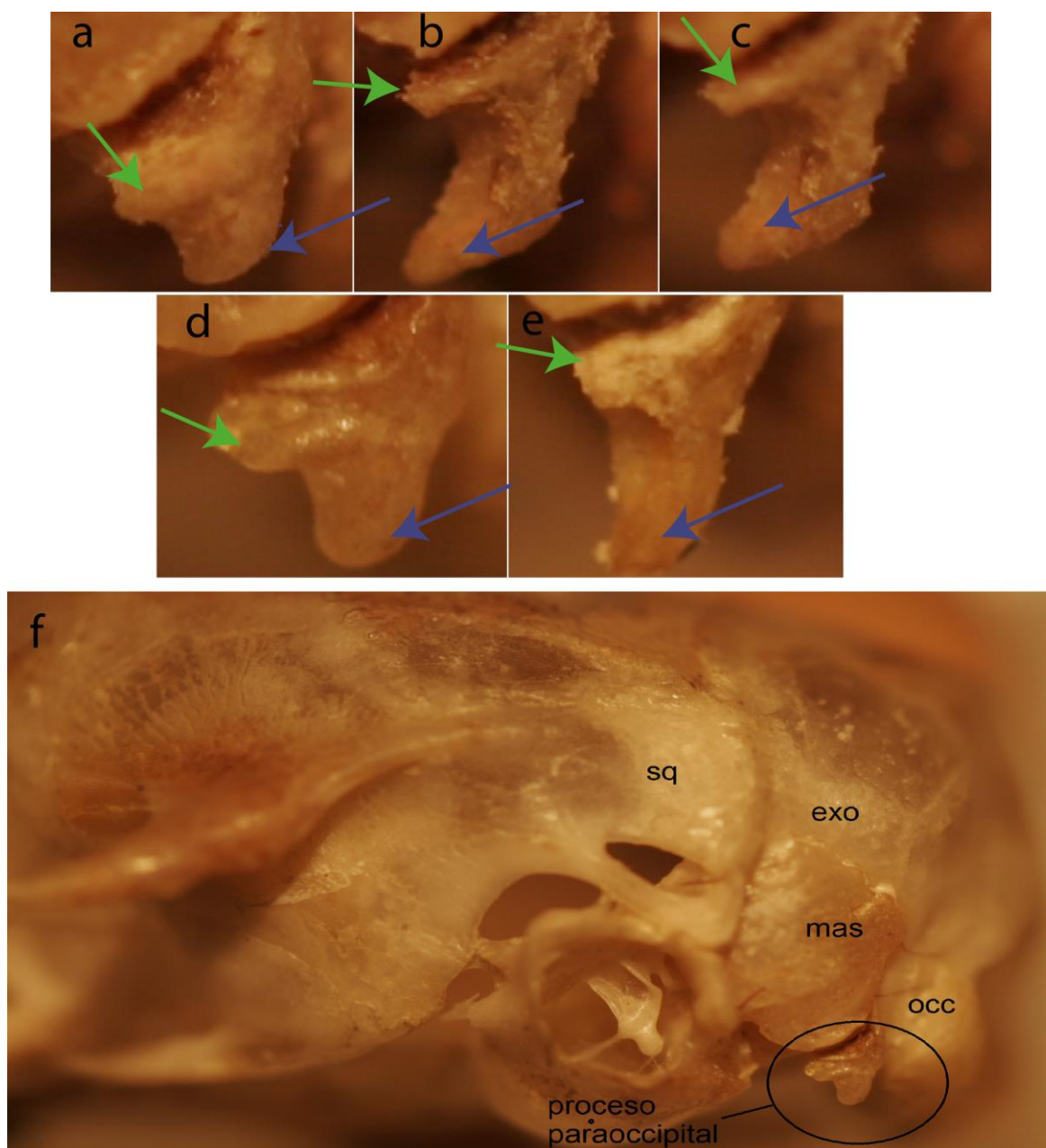


Figura 13. Vista lateral del proceso paraoccipital. Escamoso (sq), exoccipital (exo), mastoideo (mas), cóndilo occipital (occ). El círculo marca la ubicación del proceso paraoccipital. La flecha verde muestra el extremo superior y la flecha azul el extremo inferior del proceso paraoccipital. (a) QCAZ-M 13225, subclado AI. (b) QCAZ-M 14932, subclado AII. (c) QCAZ-M 14762, clado B. (d) QCAZ-M 13287, subclado CI. (e) QCAZ-M 9876, subclado CII. (f) vista lateral de la parte posterior del cráneo.

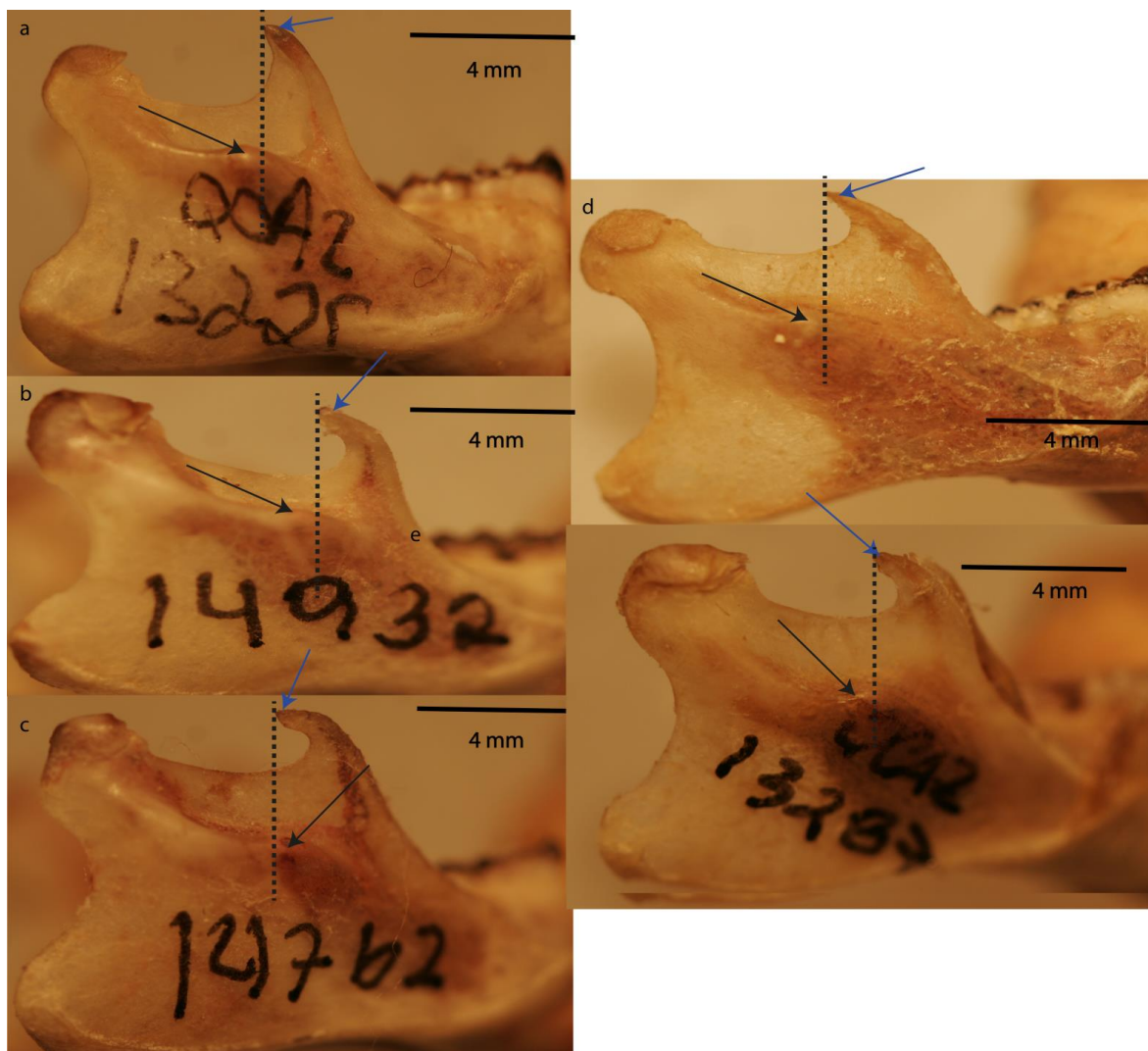


Figura 14. Vista lateral de la mandíbula. (a) QCAZ-M 13225, subclado AI. (b) QCAZ-M 14932, subclado AII. (c) QCAZ-M 14762, clado B. (d) QCAZ-M 13287, subclado CII. (e) QCAZ-M 9876, subclado CI. La flecha azul muestra el extremo distal del proceso coronoideo. La flecha negra muestra al proceso capsular. La línea entrecortada muestra la posición de la punta del proceso coronoideo con respecto al proceso capsular.



Figura 15. Pieles de los grupos filogenéticos del género *Nephelomys*. a – e vista dorsal y f – j vista ventral (a) QCAZ-M 13225, subclado AI. (b) QCAZ-M 14932, subclado AII. (c) QCAZ-M 14762, clado B. (d) QCAZ-M 13287, subclado CI. (e) QCAZ-M 9876, subclado CII.

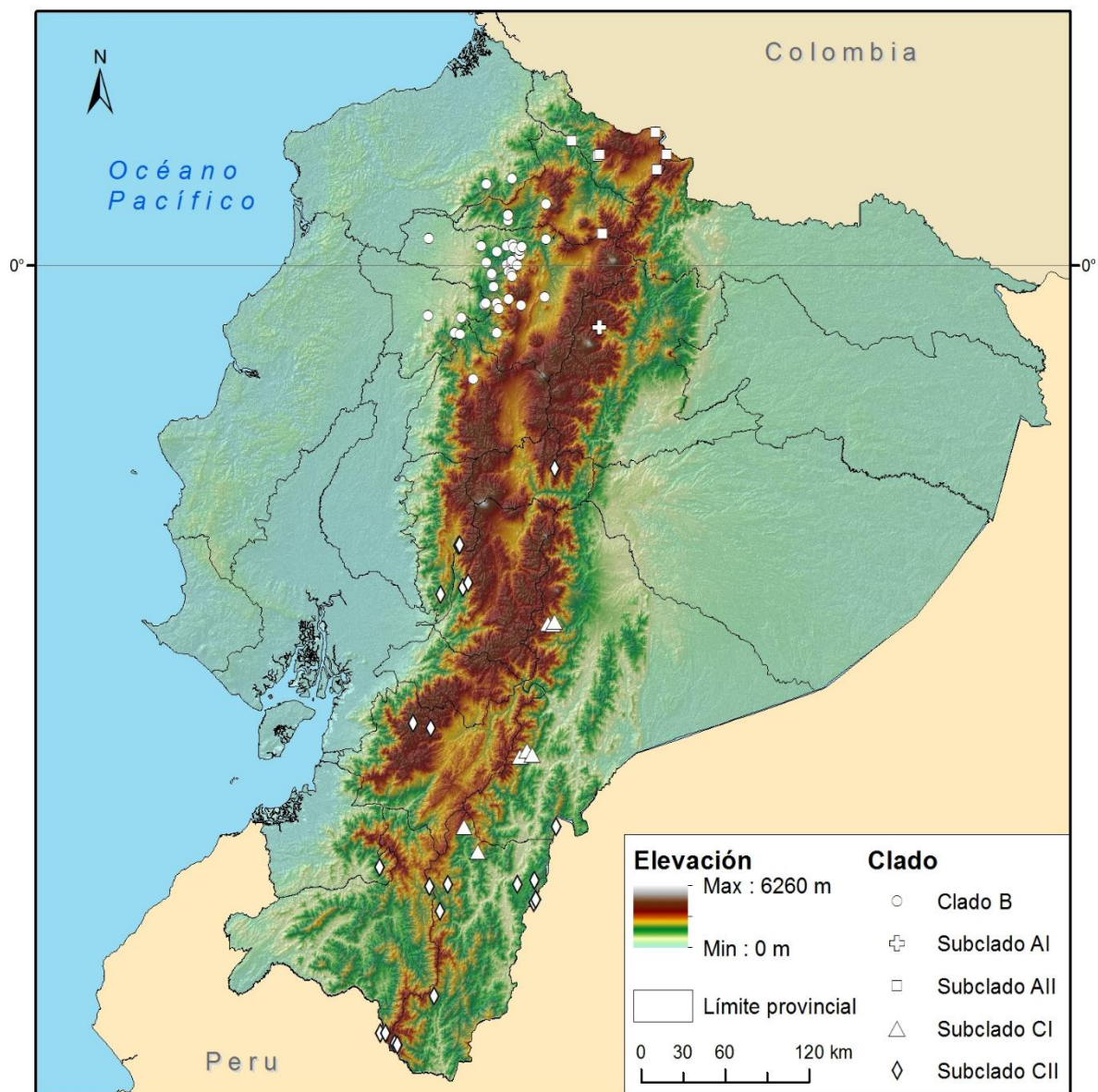


Figura 17. Localización geográfica de los clados y subclados obtenidos en base al gen mitocondrial citocromo b. Las cruces representan al subclado AI, y los cuadrados al subclado AII, los círculos representan al clado B, los triángulos al subclado CI y los rombos al subclado CII.

9. TABLAS

Tabla 1. Distancias genéticas corregidas en base al modelo Kimura-2 parámetros del gen citocromo b.

	AI	AII	B	CI	CII	A	C	N. auriven ter	N. levipe s	M. hammo ndi
AI	0									
AII	5,72 ± 1,07	0								
B	5,91 ± 0,85	6,91 ± 0,85	0							
CI	7,61 ± 0,93	8,76 ± 1,05	7,41 ± 0,96	0						
CII	7,57 ± 0,92	8,01 ± 0,86	6,7 ± 0,82	4,71 ± 0,64	0					
A	- 7,27 ± 0,87	- 7,8 ± 0,91	0,85 6,62 ± 0,77	0,69 - -	0,91 7,6 ± -	0 7,3 ± 0,82				
C							0			
N. auriven ter	9,14 ± 0,95	10,23 ± 1,03	9,1 ± 1,05	10,4 ± 0,11	10,08 ± 0,85	9,28 ± 0,88	7,91 ± 0,82	0		
N. levipes	9,67 ± 1,10	10,97 ± 1,25	10,54 ± 1,20	10,69 ± 1,28	10,97 ± 1,22	10,78 ± 1,14	10,68 ± 1,21	10,75 ± 1,14	0	
M. hammo ndi	9,82 ± 1,17	11,53 ± 1,23	10,62 ± 1,28	13,15 ± 1,48	12,93 ± 1,38	11,51 ± 1,21	10,8 ± 1,26	10,75 ± 1,18	12,08 ± 1,37	0

Tabla 2. Distancias genéticas p no corregidas y corregidas (desviación estándar) en base a tres modelos de sustitución Jukes-Cantor y Tamura Nei, del gen Cytb y el intrón Fgb-7.

Gen	Comparaciones	p sin corregir	JC	TN
Cytb	Clado A vs Clado B	6,41 ± 1,07	6,71 ± 0,85	6,88 ± 0,95
	Clado A vs Clado C	7,5 ± 0,93	7,91 ± 0,94	8,10 ± 1,06
	Clado B vs Clado C	6,32 ± 0,78	6,60 ± 0,82	6,71 ± 0,91
	Subclado AI vs Subclado AII	5,42 ± 0,73	5,42 ± 0,74	5,78 ± 0,90
	Subclado CI vs Subclado CII	3,66 ± 0,57	3,66 ± 0,64	3,80 ± 0,62
	<i>N. auriventer</i> vs <i>N. albigularis</i>	8,54 ± 1,00	9,07 ± 1,13	9,37 ± 1,10
			10,77 ±	10,90 ±
	<i>N. leavips</i> vs <i>N. albigularis</i>	10,03 ± 1,05	1,13	1,25
Fgb-7	<i>N. moerex</i> vs <i>N. albigularis</i>	6,27 ± 0,80	6,54 ± 0,90	6,41 ± 0,84
	<i>N. auriventer</i> vs <i>N. albigularis</i>	1,66 ± 1,31	1,68 ± 1,26	1,72 ± 1,23
	Clado A y B	1,05 ± 0,35	1,06 ± 0,39	1,06 ± 0,33

Tabla 3. Distancias genéticas del gen Cytb y el intrón Fgb-7 reportadas en otros trabajos sobre roedores.

Gen	Taxón	Distancia	Modelo de sustitución	Fuente
Cytb	<i>Abrothrix</i>	5 - 10%	Kimura-2	D'Elía <i>et al.</i> , 2015
	<i>Akodon boliviensis</i> (grupo)	2,8 - 7,7%	p -sin corregir	Jayat <i>et al.</i> , 2010
	<i>Akodon</i> (grupo)	1 - 14%	Kimura-2 / Jukes-Cantor	D'Elía 2003
	<i>Melanomys</i>	4,5 - 7,6%	Kimura-2	Hanson y Bradley, 2008
	<i>Necromys</i>	1 - 10%	Kimura-2 / Jukes-Cantor	D'Elía <i>et al.</i> , 2008
	<i>Neusticomys</i>	8,50%	Kimura-2	Hanson <i>et al.</i> , 2015
	<i>Oecomys</i>		Kimura-2	Rosa <i>et al.</i> , 2012
	<i>Oligoryzomys</i>	4,45 - 15%	Kimura-2	Miranda 2007; Rogers 2009, Palma <i>et al.</i> , 2010, Richter <i>et al.</i> , 2010 Hanson <i>et al.</i> , 2011
	<i>Rhipidomys</i>	4 – 12%	Kimura-2	De Andrade-Costa <i>et al.</i> , 2011
	<i>Rhagomys</i> , <i>Rheomys</i> , <i>Thomasomys</i>	2,2 - 5,76%	Jukes-Cantor	D'Elía <i>et al.</i> , 2006
Fgb-7	<i>Oligoryzomys</i>	0,8 - 3%	Tamura-3 parametros	Agrellos <i>et al.</i> , 2012
	<i>Sigmodon</i>	0,43 - 12,67 %	Kimura-2	Carrol y Bradley, 2005, Henson y Bradley, 2009
	<i>Oligoryzomys</i>	0,8 - 3%	Tamura-3 parametros	Agrellos <i>et al.</i> , 2012

Tabla 4. Resultados del análisis de delimitación de especies en base al P (AB), pID del género *Nephelomys*, a partir del árbol bayesiano del gen Cytb y del intrón Fgb-7. pID es la probabilidad media de que una especie putativa esté dentro (pIDEstricto), o sea hermana (pIDLiberal) de las especies del clado en un árbol, con un 95% como mínimo de intervalo de confianza. P(AB) es la probabilidad de monofilia recíproca bajo el modelo nulo de coalescencia randómica.

Gen	Clados	Monofilia	pID (Estricto)	pID (Liberal)	Rosenberg's P(AB)
Cytb	A vs B	Si	0,80 (0,71 – 0,88)	0,93 (0,88 – 0,99)	1,1E ⁻¹⁵
	B vs C	Si	0,91 (0,86 – 0,96)	0,97 (0,94 – 1,00)	1,7E ⁻²³
	CI vs CII	Si	0,89 (0,83 – 0,96)	0,96 (0,92 – 1,00)	6,4E ⁻¹²
Fgb-7	A vs B	Si	0,81 (0,72 – 0,89)	0,94 (0,88 – 0,99)	1,6E ⁻¹¹

Tabla 5. Soportes de las especies putativas obtenidas del modelo PTP en base al árbol filogenético de Inferencia Bayesiana del gen Cytb y el intrón Fgb-7. Valores mayores a 0.90 son considerados como soportes altos.

Gen	Especie Putativa	Soporte
Cytb	1	1
	2	0,61
	3	0,87
	4	0,501
	5	0,517
Fgb-7	1	0,394
	2	0,409

Tabla 6. Análisis de varianza multivariado de los caracteres morfométricos, entre los clados A, B y C, y entre sexos. Datos transformados con Log10.

Efecto		Valor	F	gl de la hipótesis	gl del error	P
Clados	Traza de Pillai	1,471	6,158	58	136	,000*
	Lambda de Wilks	0,068	6,53	58	134	,000*
	Traza de Hotelling	5,747	6,54	58	132	,000*
	Raíz mayor de Roy	3,476	8,151	29	68	,000*
Sexos	Traza de Pillai	0,269	0,861	29	68	0,666 ^{NS}
	Lambda de Wilks	0,731	0,861	29	68	0,666 ^{NS}
	Traza de Hotelling	0,367	0,861	29	68	0,666 ^{NS}
	Raíz mayor de Roy	0,367	0,861	29	68	0,666 ^{NS}

Tabla 7. Análisis de varianza multivariado de los caracteres morfométricos, entre los clados A, B y C, y entre sexos. Datos transformados en porcentajes.

Efecto		Valor	F	gl de la hipótesis	gl del error	p
Clados	Traza de Pillai	0,741	1,512	56	144	0,026*
	Lambda de Wilks	0,38	1,577	56	142	0,017*
	Traza de Hotelling	1,312	1,64	56	140	0,010*
	Raíz mayor de Roy	0,992	2,551	28	72	0,001*
Sexos	Traza de Pillai	0,333	1,282	28	72	0,199 ^{NS}
	Lambda de Wilks	0,667	1,282	28	72	0,199 ^{NS}
	Traza de Hotelling	0,499	1,282	28	72	0,199 ^{NS}
	Raíz mayor de Roy	0,499	1,282	28	72	0,199 ^{NS}

10. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN del laboratorio de Biología Molecular.

Lisis de células y tratamiento con RNAsa

1. Colocar el stock de la Solución de lisis de células dentro de una incubadora a 55°C.
2. Colocar 10mg de tejido en un tubo de 1,5ml que contenga 300ul de la Solución de lisis de células. Macere el tejido lo mejor posible.
3. Añadir 2-5ul de Proitenasa K (20mg/ml). Mezcle con un vórtice rápido. Incube de 3-6 horas (o toda la noche si es necesario) a 55°C.
4. ES IMPORTANTE QUE LAS MUESTRAS SEAN AGITADAS A TRAVÉS DEL PROCESO DE LISIS. Se recomienda mezclar las muestras con un vórtice por lo menos cada 30 minutos.
5. Homogenice con un vórtice suave.
6. Enfríe las muestras a temperatura ambiente.

Precipitación de proteínas.

Cuando comience este paso coloque suficiente Isopropanol al 100 % dentro de una congeladora a -20 °C para 300 ul de reacción por muestra.

1. Añada 100ul de la Solución de Precipitación de Proteínas a la mezcla de las células lisadas. Realice un vórtice vigorosamente para mezclar el contenido (10-20 segundos).
2. Centrifugar a máxima velocidad (13 000 rpm) por 5 minutos. Repita si el pellet no está ajustado.

3. Traspase el sobrenadante (el cual contiene el ADN) en un tubo nuevo de 1,5 ml. (para este paso usted va a mantener el sobrenadante y descartar el pellet de proteínas el cual debe estar solidificado en el fondo del tubo).

Precipitación del ADN

1. Añada 300ul de isopropanol frío al 100 % (Usted debió haberlo enfriado a -20 °C). Mezcle invirtiendo suavemente el tubo varias veces.

2. Centrifugue a 13 000 rpm por 5 minutos.

3. Vierta el sobrenadante cuidadosamente dejando el pelet atrás (ésta vez usted va descartar el líquido y conservar el pelet que contiene el ADN).

4. Añada 300 ul de etanol al 70 % e invierta el tubo varias veces para lavar el pelet.

5. Centrifugue a 13 000 rpm por 5 minutos. Descarte el sobrenadante.

6. Deje el tubo con la tapa abierta por varias horas (o durante toda la noche si es necesario).

Hidratación del ADN y Almacenamiento

1. Añada de 50-200 ul de 10 mM Tris-Cl, pH 8,0. Entre más solución se añada, más diluida estará la muestra. Golpee suavemente la base del tubo para resuspender el ADN. Puede tomar varias horas para que el ADN completamente se resuspenda.

2. Almacene para un periodo prolongado a -20 °C o a -80 °C, o por lo contrario a 4 °C.

Anexo 2. Condiciones térmicas usada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del gen mitocondrial citocromo b y el intrón de la cadena beta del fibrinógeno.

- Citocromo b (Smith y Patton, 1993; Bonvicino y Moreira, 2001)
- Intrón de la cadena B del fibrinógeno (Wickliffe *et al.*, 2003)

Gen	Primers		Temperaturas
Cytb	MVZ05 5'-TCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC-3'	1 ciclo	94° C por 2 min
		35	93°C por 2 min
	MVZ16 5'-CTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'	ciclos	45°C por 1.5 min
			72°C por 2 min
		1 ciclo	72°C por 5 min
Fgb-7	Fgb-I7U-Rattus 5'- ACCCCAGTAFTATCTGCCATTCGGATT-3'	1 ciclo	94° C por 2 min
		35	94°C por 40 seg*
	Fgb-I7L-Rattus 5'- GGGGAGAACAGAACCATGACCATCCAC-3'	ciclos	53°C por 45 seg*
			72°C por 90 seg*
		1 ciclo	72°C por 5 min
Cytb, citocromo b; Fgb-7 intrón del beta fibrinógeno; * temperaturas modificadas en algunos casos.			

Anexo 3. Estrategias de particiones utilizadas en los análisis filogenéticos para el gen Cytb y el intron Fgb-7.

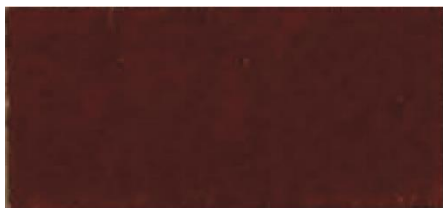
Gen	Estrategia de partición	Modelo de evolución
Cytb	(1) (2) (3)	(1 pos) SYM+I+G
		(2 pos) F81+I+G
		(3 pos) HKY+I+G
Fgb-7	(1, 2, 3)	HKY+I
Cytb + Fgb-7	(1) (2) (3)/(1,2,3)	(1 pos) SYM+I+G
		(2 pos) F81+I+G
		(3 pos) HKY+I+G
		(1,2,3) HKY+I

Anexo 4. Medidas craneales y mandibulares.

Símbolo	Descripción
BB	Ancho de la caja craneal: distancia máxima entre el borde justo anterior a las raíces escamosas del arco zigomático y su borde correspondiente al otro lado del cráneo.
BBP	Ancho de la placa ósea: distancia entre los protoflexus del lado labial del primer molar superior.
BIF	Ancho del foramen incisivo: ancho entre ambos lados de la sutura de la maxila y premaxila.
BM 1	Ancho del primer molar superior: distancia entre el paraflexus y protoflexus del molar superior.
BN	Ancho del nasal: distancia máxima entre los nasales, medida a la altura de la raíz de los incisivos.
BOC	Ancho de los cóndilos occipitales: distancia entre los bordes más externos de los lóbulos occipitales.
BPB	Ancho del puente palatino: distancia entre los protoflexus de los molares superiores.
BR	Ancho del rostro: distancia entre las capsulas nasolacrimales.
BZP	Ancho de la placa zigomática: porción más ancha entre el margen posterior y anterior de la placa zigomática.
CIL	Longitud cóndilo incisivo: distancia entre el borde anterior de la raíz del incisivo y el borde más posterior del basioccipital.
CLM 1_3	Longitud oclusal de la hilera dental maxilar: distancia entre las coronas del molar superior uno y tres.
DI	Profundidad del incisivo: medida tomada a través de las cúspides de los dos incisivos.
HI	Altura del incisivo: distancia máxima entre la raíz del incisivo superior y su extremo distal.
IAL	Longitud oclusal de la hilera dental mandibular: distancia entre el borde anterior de la corona del molar inferior 1 y el borde posterior.
IB	Ancho interorbital: la distancia mínima de la constricción interorbital.
IDL	Longitud del diastema inferior: distancia entre el borde posterior del incisivo inferior y el borde anterior del molar inferior, ambas a la altura de la raíz.
LB	Ancho lamboidal: distancia máxima entre las crestas lamboidales a cada lado del cráneo.
LBP	Longitud de la placa ósea: distancia entre el borde posterior del foramen incisivo y el borde más anterior de la fosa mesopterigoidea.
LD	Longitud de diastema: distancia entre el margen anterior de la raíz del primer molar superior y el margen posterior de los incisivos superiores.
LIF	Longitud del foramen incisivo: máxima distancia interna entre los bordes

Símbolo	Descripción
	anterior y posterior del foramen incisivo.
LN	Longitud nasal: máxima distancia desde el borde más anterior del nasal al borde más posterior.
MB	Ancho del mastoideo: distancia desde la parte media del hueso mastoideo a cada lado.
MH	Altura mandibular: distancia entre el borde más superior del proceso condilar y el borde más inferior del proceso angular de la mandíbula.
MPFW	Ancho de la fosa mesopterigoidea: distancia entre los borde laterales de la fosa mesopterigoidea.
ONL	Longitud occipitonasal: desde el borde más anterior de los nasales hasta el extremo más posterior del supraoccipital.
PPL	Longitud postpalatal: distancia entre el borde anterior de la fosa mesopterigoidea y el borde más anterior del foramen mágnun.
RL	Longitud del rostro: distancia entre la muesca del zigomático, ubicado lateral al hueso lacrimal, y el margen anterior del hueso nasal
ZB	Ancho del zigomático: distancia más ancha entre los dos arcos zigomáticos, se toma en la sutura del escamoso y yugal a cada lado del arco zigomático
ZIL	Longitud zigomática interna: distancia interna máxima entre las raíces escamosas y yugal del arco zigomático.

Anexo 5. Colores identificados en base a Ridgway (1912).



Bermejo



Leonado



Cenizo verde palido



Rojo Prusiano



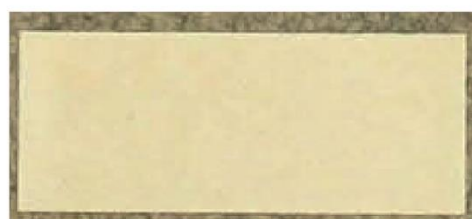
Sepia caliente oscuro



Gris blancuzco



Marron verona

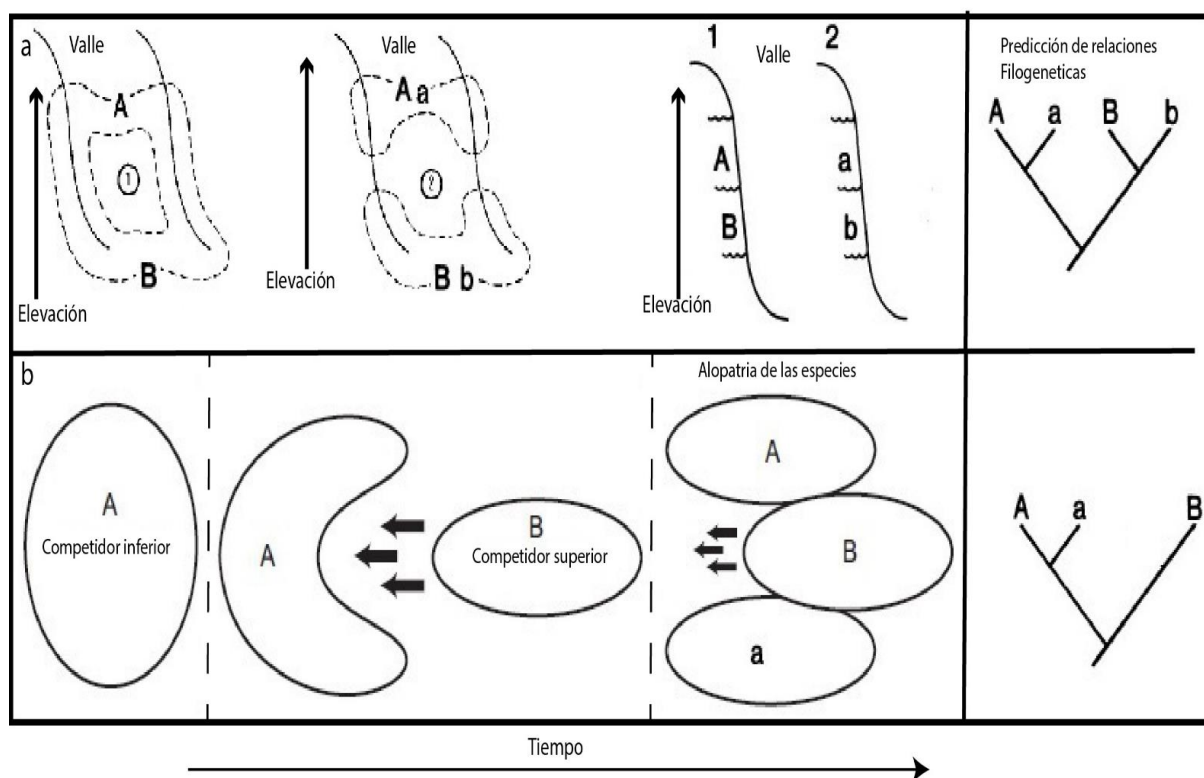


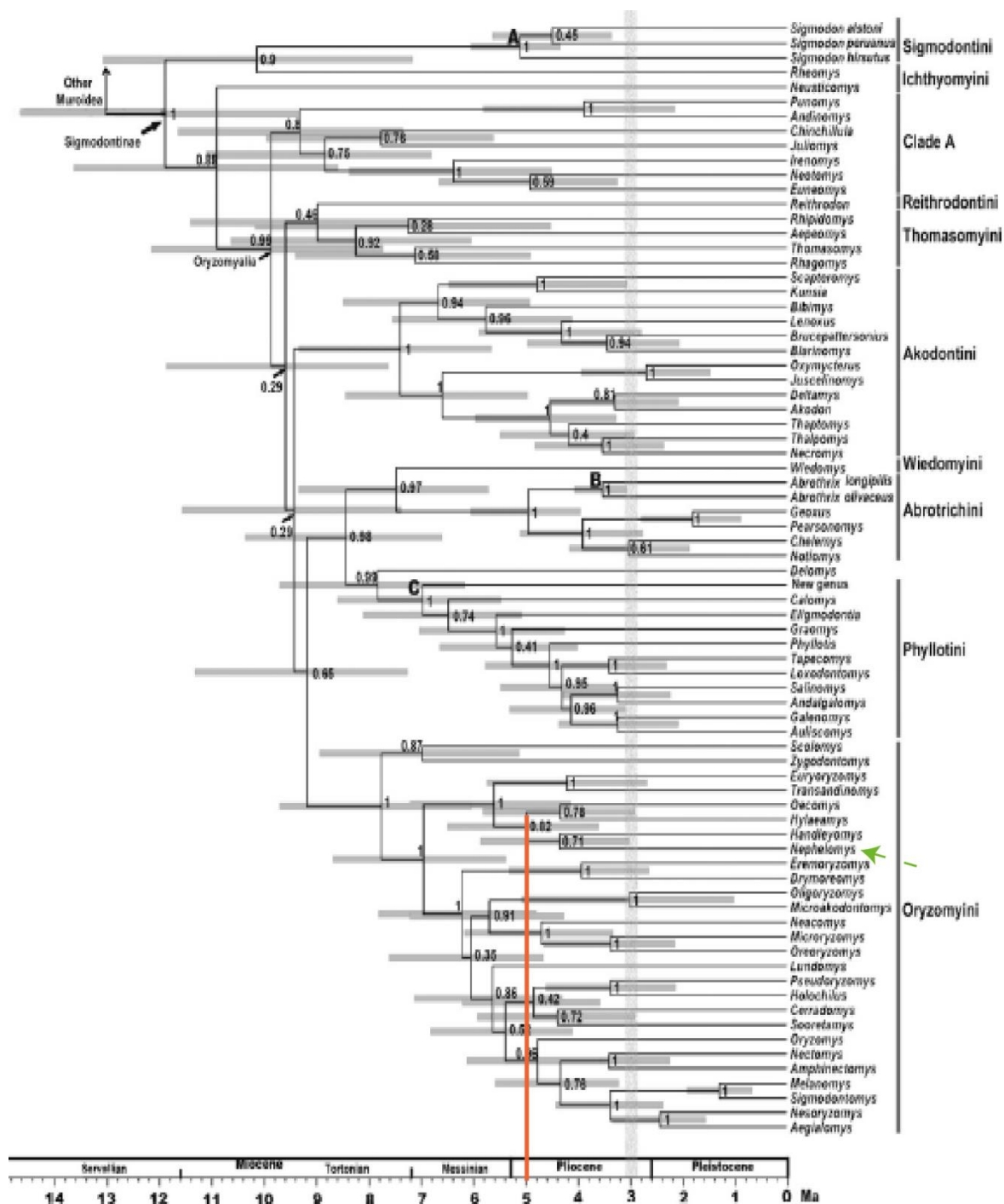
Amarilo marfil



Blanco

Anexo 6. Mecanismo de especiación alopátrica, reportado para micromamíferos no voladores. (a) Mecanismo de especiación alopátrica por vicarianza, modificado de Patton y Smith (1992). (b) Mecanismo de especiación alopátrica por interacciones ecológicas (Intrusión), modificado de Gutiérrez y colaboradores (2014), en este caso B puede o no estar relacionado con A.





Anexo 8. Lista de individuos incluidos en las reconstrucciones filogenéticas.

Cytb			Fgb-7		
1	MECN 086	QCAZ-M 11605	1	MECN 086	QCAZ-M 13024
2	MECN 1824	QCAZ-M 11606	2	MEPN 10029	QCAZ-M 13030
3	MEPN 10029	QCAZ-M 11607	3	MEPN 10659	QCAZ-M 13035
4	MEPN 10659	QCAZ-M 11608	4	MEPN 10662	QCAZ-M 13056
5	MEPN 12132	QCAZ-M 11609	5	MEPN 11205	QCAZ-M 13057
6	MEPN 12133	QCAZ-M 11663	6	MEPN 12132	QCAZ-M 13060
7	MEPN 6045	QCAZ-M 11665	7	MEPN 12133	QCAZ-M 13063
8	MEPN 6046	QCAZ-M 11666	8	MEPN 6046	QCAZ-M 13211
9	MEPN 6100	QCAZ-M 13024	9	MEPN 6100	QCAZ-M 13214
10	MEPN 6101	QCAZ-M 13030	10	MEPN 6101	QCAZ-M 13216
11	MEPN 6102	QCAZ-M 13032	11	MEPN 6102	QCAZ-M 13221
12	MEPN 7294	QCAZ-M 13035	12	MEPN 7329	QCAZ-M 13222
13	MEPN 7329	QCAZ-M 13036	13	MEPN 7331	QCAZ-M 13225
14	MEPN 7331	QCAZ-M 13052	14	QCAZ-M 1592	QCAZ-M 13226
15	QCAZ-M 873	QCAZ-M 13056	15	QCAZ-M 4287	QCAZ-M 13281
16	QCAZ-M 1068	QCAZ-M 13057	16	QCAZ-M 4813	QCAZ-M 13283
17	QCAZ-M 1069	QCAZ-M 13060	17	QCAZ-M 4820	QCAZ-M 13290
18	QCAZ-M 1592	QCAZ-M 13063	18	QCAZ-M 6430	QCAZ-M 14680
19	QCAZ-M 1680	QCAZ-M 13211	19	QCAZ-M 8865	QCAZ-M 14681
20	QCAZ-M 1819	QCAZ-M 13212	20	QCAZ-M 9875	QCAZ-M 14682
21	QCAZ-M 1828	QCAZ-M 13214	21	QCAZ-M 9876	QCAZ-M 14683
22	QCAZ-M 1830	QCAZ-M 13215	22	QCAZ-M 9878	QCAZ-M 14748
23	QCAZ-M 4287	QCAZ-M 13216	23	QCAZ-M 1069	QCAZ-M 14750
24	QCAZ-M 4297	QCAZ-M 13221	24	QCAZ-M 11663	QCAZ-M 14762
25	QCAZ-M 4813	QCAZ-M 13222	25	QCAZ-M 11666	QCAZ-M 14932
26	QCAZ-M 4820	QCAZ-M 13223			
27	QCAZ-M 6430	QCAZ-M 13224			
28	QCAZ-M 6431	QCAZ-M 13225			
29	QCAZ-M 6442	QCAZ-M 13226			
30	QCAZ-M 6533	QCAZ-M 13281			
31	QCAZ-M 8329	QCAZ-M 13283			
32	QCAZ-M 8330	QCAZ-M 13287			
33	QCAZ-M 8768	QCAZ-M 13290			
34	QCAZ-M 8769	QCAZ-M 13294			
35	QCAZ-M 8865	QCAZ-M 14680			
36	QCAZ-M 9875	QCAZ-M 14681			
37	QCAZ-M 9876	QCAZ-M 14683			
38	QCAZ-M 9878	QCAZ-M 14748			
39	QCAZ-M 9885	QCAZ-M 14750			
40	QCAZ-M 11600	QCAZ-M 14762			
41	QCAZ-M 11604	QCAZ-M 14932			

Anexo 9. Secuencias obtenidas del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI), y utilizadas en las reconstrucciones filogenéticas.

Voucher	Especie	Numero de accesoión	Cytb	Fgb-7
MEPN7047*	<i>Euryoryzomys macconnelli</i>	Presente Estudio	x	
QCAZ-M 4987*	<i>Euryoryzomys macconnelli</i>	Presente Estudio	x	
AMNH272678*	<i>Euryoryzomys macconnelli</i>	EU579484	x	
MNFS747*	<i>Euryoryzomys macconnelli</i>	AF251527	x	
QCAZ-M 14766*	<i>Handleyomys alfaroi</i>	Presente Estudio	x	
TK135639*	<i>Handleyomys alfaroi</i>	EU579488	x	
MEPN12092	<i>Mindomys hammondi</i>	Presente Estudio	x	x
QCAZ-M 12041*	<i>Neacomys spinosus</i>	Presente Estudio	x	x
UFES928*	<i>Nectomys squamipes</i>	JQ966235	x	x
AMNH268125	<i>Nephelomys albigularis</i>	EU579505	x	
JBM322	<i>Nephelomys auriventer</i>	Presente Estudio	x	
JBM722	<i>Nephelomys auriventer</i>	Presente Estudio	x	x
MEPN12214	<i>Nephelomys auriventer</i>	Presente Estudio	x	
MVZ171468	<i>Nephelomys leavips</i>	JF693875	x	
UFES247*	<i>Oecomys catherinae</i>	JQ966233	x	x
EU073177*	<i>Sigmodon hispidus</i>	TK137315	x	x
MVZ170076*	<i>Thomasomys aureus</i>	U03540	x	x
DQ179812*	<i>Tylomys nudicaudus</i>	TK41551	x	x
TTU76306*	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	EU579519	x	x

*individuos utilizados como grupo externo.

Anexo 9. Lista de especímenes utilizados en los análisis morfométricos.

MECN 085	MECN 2826	QCAZ-M 2428	QCAZ-M 13041	QCAZ-M 13215
MECN 086	MECN 2827	QCAZ-M 2429	QCAZ-M 13042	QCAZ-M 13216
MECN 1083	MECN 2829	QCAZ-M 2430	QCAZ-M 13043	QCAZ-M 13217
MECN 1084	MECN 2830	QCAZ-M 4287	QCAZ-M 13046	QCAZ-M 13218
MECN 1131	MECN 2832	QCAZ-M 4323	QCAZ-M 13056	QCAZ-M 13219
MECN 1339	MECN 579	QCAZ-M 4813	QCAZ-M 13057	QCAZ-M 13223
MECN 1340	MECN 581	QCAZ-M 4819	QCAZ-M 13109	QCAZ-M 13225
MECN 1576	MEPN 10030	QCAZ-M 6427	QCAZ-M 13110	QCAZ-M 13281
MECN 1824	MEPN 10652	QCAZ-M 6428	QCAZ-M 13111	QCAZ-M 13283
MECN 2479	MEPN 11200	QCAZ-M 6429	QCAZ-M 13112	QCAZ-M 13285
MECN 2485	MEPN 11205	QCAZ-M 6430	QCAZ-M 13113	QCAZ-M 13287
MECN 2486	MEPN 11864	QCAZ-M 6431	QCAZ-M 13114	QCAZ-M 13289
MECN 2496	MEPN 12132	QCAZ-M 6433	QCAZ-M 13115	QCAZ-M 13290
MECN 2525	MEPN 12133	QCAZ-M 6435	QCAZ-M 13116	QCAZ-M 14682
MECN 2538	MEPN 12181	QCAZ-M 6436	QCAZ-M 13117	QCAZ-M 14683
MECN 2539	MEPN 12182	QCAZ-M 6437	QCAZ-M 13118	QCAZ-M 14748
MECN 2541	MEPN 12183	QCAZ-M 6439	QCAZ-M 13119	QCAZ-M 14751
MECN 2544	MEPN 12184	QCAZ-M 6441	QCAZ-M 13120	QCAZ-M 14755
MECN 2549	MEPN 12186	QCAZ-M 6443	QCAZ-M 13121	QCAZ-M 14756
MECN 2550	MEPN 12214	QCAZ-M 9875	QCAZ-M 13122	QCAZ-M 14758
MECN 2551	MEPN 12492	QCAZ-M 9876	QCAZ-M 13123	QCAZ-M 14762
MECN 2552	MEPN 12493	QCAZ-M 11604	QCAZ-M 13124	QCAZ-M 14932
MECN 2708	MEPN 12497	QCAZ-M 11605	QCAZ-M 13125	
MECN 2722	MEPN 12498	QCAZ-M 11606	QCAZ-M 13126	
MECN 2725	MEPN 12513	QCAZ-M 11610	QCAZ-M 13127	
MECN 2730	MEPN 12514	QCAZ-M 11611	QCAZ-M 13128	
MECN 2731	MEPN 12524	QCAZ-M 11662	QCAZ-M 13129	
MECN 2732	MEPN 12526	QCAZ-M 11663	QCAZ-M 13130	
MECN 2733	MEPN 12552	QCAZ-M 11664	QCAZ-M 13131	
MECN 2734	MEPN 12555	QCAZ-M 11665	QCAZ-M 13132	
MECN 2735	MEPN 5994	QCAZ-M 13023	QCAZ-M 13133	
MECN 2736	MEPN 6033	QCAZ-M 13024	QCAZ-M 13134	
MECN 2737	MEPN 6034	QCAZ-M 13028	QCAZ-M 13135	
MECN 2738	MEPN 6035	QCAZ-M 13030	QCAZ-M 13136	
MECN 2739	MEPN 6036	QCAZ-M 13031	QCAZ-M 13137	
MECN 2740	MEPN 6037	QCAZ-M 13032	QCAZ-M 13138	
MECN 2816	MEPN 6038	QCAZ-M 13034	QCAZ-M 13139	
MECN 2817	MEPN 6039	QCAZ-M 13035	QCAZ-M 13140	
MECN 2818	MEPN 6045	QCAZ-M 13037	QCAZ-M 13200	
MECN 2819	MEPN 6101	QCAZ-M 13038	QCAZ-M 13207	
MECN 2820	MEPN 6102	QCAZ-M 13039	QCAZ-M 13213	
MECN 2824		QCAZ-M 13040	QCAZ-M 13214	

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Nicolás Oswaldo Tinoco Lopez, C.I. 171639746-6, autor del trabajo de graduación titulado: “Caracterización molecular, morfológica y morfométrica del complejo *Nephelomys albigularis* Tomes, 1860 (Rodentia: Cricetidae), y su distribución en el Ecuador.”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 18 de Noviembre del 2015

Sr. Nicolás Oswaldo Tinoco Lopez

C.I. 171639746-6